

HEIMBERT IHLEFELD

Diplom-Physiker

**Untersuchung des turnover einer
mikrosomalen Monooxygenase.
Messung und modellhafte Analyse
der Anfangskinetik des Enzymsystems.**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften an der Universität Bremen**

1980

Bremen 1979

HEIMBERT IHLEFELD
Diplom-Physiker

Untersuchung des turnover einer mikrosomalen
Monooxygenase. Messung und modellhafte
Analyse der Anfangskinetik des Enzymsystems

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften an der Universität Bremen

Bremen, November 1979



HEIMBERT IHLEFELD

Diplom-Physiker

Untersuchung des turnover einer mikrosomalen
Monooxygenase. Messung und modellhafte
Analyse der Anfangskinetik des Enzymsystems

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften an der Universität Bremen

Diese Arbeit hat dem Promotionsausschuß Dr.rer.nat./
Dr.ing. der Universität Bremen als Dissertation vor-
gelegen. An dem Promotionsverfahren haben Prof. Dr.
H. Diehl und Prof. Dr. V. Ullrich als Gutachter mit-
gewirkt. Das Kolloquium hat am 28.1.1980 stattgefunden..



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543102_0018

A b s t r a c t

IHLEFELD, HEIMBERT:

UNTERSUCHUNG DES TURNOVER EINER MIKROSOMALEN MONOOXYGENASE. MESSUNG UND MODELLHAFTE ANALYSE DER ANFANGSKINETIK DES ENZYMSYSTEMS

Das terminale Enzym des Monooxygenasesystems, Cytochrom P-450, tritt in verschiedenen Subspezies mit überlappenden Substratspezifitäten auf, und i.a. ist die Anzahl der für eine Substratumsetzung jeweils "aktiven" Cytochrom-Moleküle nicht bekannt. Die experimentelle Methode zur unmittelbaren Untersuchung der Kinetik des Cytochrom P-450-Zyklus benutzt die photoreversible Inhibierung der Cytochrom P-450-Aktivität durch CO; die photolytische Bestrahlung des enzymatischen Ansatzes verursacht einen Relaxationsvorgang des Monooxygenasesystems, die "Anfangskinetik" des Systems, die mit der Produktrate einer speziellen Substratumsetzung (hier: Hydroxilierung von Cumarin zu 7-Hydroxy-Cumarin) nachgewiesen wird. Die Anfangskinetik der Monooxygenase ergibt sich als Überlagerung zweier "kinetischer Systeme", die auf die Aktion des Cytochrom P-450-Zyklus einmal und auf die Wechselwirkung von Cytochrom P-450 und Cytochrom P-450-Reduktase in Gegenwart von CO zum anderen zurückgeführt werden. Für die Aktion des Cytochrom P-450 wird ein Modellzyklus entwickelt, der auf der allgemein akzeptierten Struktur des Reaktionszyklus des Cytochroms basiert. Erweitert um einen phänomenologischen Ansatz für die Wechselwirkung von Cytochrom und Reduktase reproduziert das Modell die wesentlichen Merkmale der Anfangskinetik. Die Analyse der Anfangskinetik der Cumarin-Monooxygenase an Hand dieses Modells führt zu folgenden Resultaten: (1) die Geschwindigkeitskonstanten der beiden limitierenden Schritte des Cytochrom P-450-Modellzyklus haben Werte im Bereich um 0.5 s^{-1} , (2) für die "aktiven" Enzymmoleküle ergibt sich eine Wechselzahl von 20 min^{-1} , (3) schätzungsweise nur 2% - 8% der spektral nachweisbaren Cytochrom P-450 Moleküle sind am Cumarin-Metabolismus beteiligt. Offenbar beruht die spezifische Aktivität der Monooxygenasen sowohl auf der Anzahl "aktiver" Enzymsubstrat-Komplexe als auch auf unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften der Cytochrom P-450-Subspezies.

INHALTSÜBERSICHT

<u>1. Einleitung</u>	1
Literatur	4
<u>2. Die experimentelle Methode</u>	5
2.1 Die Methode: die Messung der Anfangskinetik	6
Relaxation und Anfangskinetik	7
Die Anfangskinetik des Cytochrom P-450-Systems	8
Nachweis der Kinetik	10
2.2 Das Meßverfahren	11
2.3 Zusammenhang von Anfangskinetik und Produktzuwachs	12
2.4 Literatur	14
<u>3. Experimentelles</u>	15
3.1 Die Meßapparatur	15
"Flash Photolysis"	16
Die Fluorimetrie	17
3.2 Mikrosomen und enzymatische Ansätze	20
3.3 Literatur	24
<u>4. Meßergebnisse</u>	25
4.1 Allgemeine Untersuchungen	25
Die Mikrosomen	25
Stabilität der Ansätze	27

Der relative Produktzuwachs	29
Reproduzierbarkeit von ΔP	30
Die Dunkelaktivität	31
Der Produktzuwachs $\Delta P(60)$	32
Die Lichtwirkung	34
Alterung der Mikrosomen	36
4.2 Meßreihen: Anfangskinetik und steady state	37
Die deskriptive Funktion $y(\tau)$	38
Anfangskinetik und steady state: $\tilde{\Delta P}(\tau)$	40
Das CO : O ₂ Verhältnis im Ansatz	45
Die Dunkel-Relaxation des Enzymsystems	48
<u>5. Auswertung und Diskussion der Meßergebnisse</u>	54
5.1 Merkmale der Produktfunktion $\Delta P(\tilde{\Delta P})$	55
5.2 Der Katalysezyklus des Cytochrom P-450	56
Der Cytochrom P-450-Substrat Komplex	57
Die Reduktion des Cytochroms	59
Die Kohlenmonoxid-Inhibierung	60
Der Cytochrom-Sauerstoff-Komplex ("spektraler Zwischenzustand")	61
Die Aktivierung des Oxy-Komplexes	62
5.3 Der Modellzyklus für Cytochrom P-450	62
Die kinetische Reduktion des katalytischen Zyklus	63
Die quantitative Formulierung des Modellzyklus: das Differentialgleichungssystem des Modells	67
Die Wechselzahl ("turnover number")	72
Der relative Produktzuwachs	74
Eigenschaften der Modellfunktion $\tilde{\Delta P}^{(o)}$	76
5.4 Die Dunkelrelaxation des Enzymsystems:	
ein Modell für das Enzymsystem	79
Die zwei kinetischen Systeme im Enzymsystem	79

Modell und Auswertung der Dunkel-Relaxation	80
Enzymatische Grundlage der zwei kinetischen Systeme	85
5.5 Die Auswertung an Hand des erweiterten Modells:	
die Parameter des Modellzyklus	90
Die erweiterte Modellfunktion $\Delta P^{(1)}$	90
Anpassung und optimierte Parameter der Modellfunktion	94
Wechselzahl und aktive Cytochrom-Moleküle	104
5.6 Literatur	109
<u>6. Zusammenfassung und Ausblick</u>	112
Anhang A: Geräte	116
Anhang B: Näherung für $(Fe)_2$	118
Anhang C: Produktfunktion ΔP_{II}	120

1. Einleitung

Mit der Entdeckung und Beschreibung des enzymatischen Mono-oxygenasesystems der Säugetierleber wurde zugleich eines seiner hervorragendsten Merkmale offenbar: die Vielfalt der chemischen Reaktionen, die das Enzymsystem katalysiert und die große Anzahl von Substraten, die von diesem System umgesetzt werden (1 / 2). In der Folge ist dieses Enzymsystem Gegenstand intensiver Untersuchungen sowohl in pharmakologischer wie in biochemischer Hinsicht (3 / 4 / 5). Die physiologische Funktion des Monooxygenasesystems der Leber und anderer (Säugetier-)Organe wie Lunge, Darm, Haut liegt in dem Metabolismus lipophiler, körperfremder Substanzen, der "Xenobiotika", für die es im Organismus keine spezifischen metabolischen Reaktionen gibt. Durch die Hydroxilierung dieser Substrate mit molekularem Sauerstoff, der "Monooxygenierung", werden die lipophilen Substanzen in wasserlösliche Derivate umgesetzt, die für den Organismus ausscheidbar sind.

Die Pharmaka stellen eine typische Gruppe der Xenobiotika dar, wenn auch nur eine kleine. Weitaus größer ist die Zahl der Stoffe, mit denen der menschliche Organismus Tag für Tag in Kontakt kommt. Dazu zählen vor allem die Chemikalien, die mit der Entwicklung der chemischen Industrie und in der Folge der großindustriellen Erzeugung immer neuer Substanzen - vor allem innerhalb der letzten dreißig Jahre, nach dem Zweiten Weltkrieg - in den hochindustrialisierten Ländern - und nicht nur dort - allgemein verbreitet sind, und denen der menschliche Organismus heute ausgesetzt ist.

Wurde zu Beginn der Forschung über das Leber-Monooxygenasesystem ausschließlich dessen Funktion bei der Ausscheidung von Fremdstoffen aus dem (menschlichen) Organismus gesehen, die "detoxifizierende" Wirkung des Monooxygenasesystems (1), so zeigte sich in der Folge, daß es bestimmte Gruppen von Verbindungen gibt, bei denen der Mechanismus der Monooxygenierung mit der Bildung hochreaktiver Metabolite die Toxizität

dieser Substanzen erhöht (6); die Unspezifität der Fremdstoff-Monooxygenasen, notwendig für die physiologische Funktion in der Ausscheidung der Fremdstoffe, erlaubt auf der anderen Seite keine Differenzierung zwischen toxischierenden und detoxifizierenden Reaktionen. Angesichts des ambivalenten Charakters der Wirkung der Monooxygenasen erscheint es von vitalem Interesse, den Wirkungsmechanismus dieses Enzymsystems vollständig aufzuklären.

Das Monooxygenasesystem wird charakterisiert durch das "terminale Enzym" des Systems (5), das Cytochrom P-450, ein Hämprotein, das sich spektroskopisch durch die ungewöhnliche Lage seiner Soretbande bei 450 nm identifizieren läßt. Das Cytochrom P-450, an das Sauerstoff und Substrat binden, weist - wenigstens - zwei verschiedene Formen von Absorptionsspektren auf, abhängig vom jeweils gebundenen Substrat; das Cytochrom kann differenziert werden nach einem "high spin"- und einem "low spin"-Zustand und nach einer formal zweiwertigen oder dreiwertigen Form des zentralen Eisenatoms. Die substratspezifische Aktivität des ganzen Monooxygenasesystems ist darüber hinaus durch eine Reihe von Faktoren bedingt, wie die Tierart oder die Vorbehandlung der Tiere mit verschiedenen, das Monooxygenasesystem spezifisch induzierenden Substanzen.

Seit einigen Jahren sind verschiedene Formen des Cytochrom P-450 nachgewiesen worden, die sich durch deutliche, aber nicht scharf abgrenzbare Substratspezifitäten, durch ihre unterschiedliche Induzierbarkeit und durch elektrophoretisch bestimmte, unterschiedliche Molekulargewichte manifestieren (7 / 8). Es liegt nahe, die breit streuende Substratspezifität des Monooxygenasesystems auf die Wechselwirkung der Substrate mit den verschiedenen Formen des Cytochrom P-450 zurückzuführen. Eine Zuordnung der Substratspezifitäten zu bestimmten Formen des Cytochroms gelingt jedoch allgemein nicht, da wir weder den "aktiven" Anteil der Cytochrome, noch die beteiligten Cytochrom P-450-Spezies, noch den "turn-over" einer der Spezies kennen. Wir können zwar davon aus-

gehen, daß der Wirkungsmechanismus für alle Fremdstoff-Monooxygenasen identisch ist wegen des allen Formen des Cytochrom P-450 gleichermaßen eigenen Haemeisens mit seinem charakteristischen Spektrum (9), ob jedoch die Substratspezifität nur durch die differenzierende Bindungsfähigkeit der Substrate zu den einzelnen Formen des Cytochrom P-450 zustande kommt oder durch einen unterschiedlichen turnover oder durch beide Faktoren, ist bisher nicht geklärt.

Es sind keine kontinuierlichen Messungen des turnover des Cytochrom P-450 bekannt. Einzelne Schritte im Cytochrom P-450-Zyklus sind - zum Teil ausgiebig - untersucht worden, allerdings ohne unmittelbare Korrelation mit der katalytischen Aktivität einer speziellen Substratumsetzung. In der komplexen Situation im Fall des Cytochrom P-450 erscheint es jedoch notwendig, Untersuchungen zum turnover des Cytochroms mit der unmittelbaren Bestimmung der Produktrate einer speziellen Monooxygenase zu verbinden - als Voraussetzung für eine Differenzierung der den Umsatz eines Substrates bestimmenden Faktoren.

Die vorliegende Arbeit hat den turnover des terminalen Enzyms der Monooxygenase, des Cytochrom P-450, zum Untersuchungsobjekt. Wir haben eine Methode entwickelt, den turnover einer durch Cytochrom P-450 katalysierten Substratumsetzung direkt, kontinuierlich und produktbezogen zu messen; die Methode beruht auf der Bestimmung der Anfangskinetik des Monooxygenasesystems, die durch die Produktrate der betreffenden Substratumsetzung nachgewiesen wird.

Die Methode wurde angewandt auf die Untersuchung einer speziellen Monooxygenase, der Cumarin-Hydroxylase mit dem Produkt 7-Hydroxy-Cumarin ("Umbelliferon"). Es wurde die Anfangskinetik dieses Systems unter verschiedenen experimentellen Bedingungen gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen werden gezeigt und an Hand einer phänomenologischen Darstellung

diskutiert. Wir entwickeln ein quantitatives Modell für den turnover des Cytochrom P-450 auf der Basis des allgemein akzeptierten Reaktionszyklus' des Cytochroms (9); dieses Modell ist in der Lage - mit einer Erweiterung, die auf der Struktur des Monooxygenasesystems insgesamt beruht - die Anfangskinetik mit ihren wesentlichen Merkmalen zu reproduzieren. Eine quantitative Analyse der Anfangskinetik an Hand des - erweiterten - Modells liefert uns über die Bestimmung der Wechselzahl ("turnover number") hinaus auch Angaben über die einzelnen Reaktionsschritte des Modells.

Die Untersuchungen zeigen, daß der Weg der produktbezogenen, kinetischen Analyse mit der Methode der Bestimmung der Anfangskinetik gangbar und erfolgversprechend ist, um zu klären, welche Faktoren die spezifische katalytische Aktivität der Fremdstoff-Monooxygenasen konstituieren.

Literatur

- (1) B.B. Brodie et al. (1955) Science 121, 603
- (2) C. Mitoma et al. (1956)/ Arch. Biochem. Biophys. 61, 431
- (3) G.J. Mannering (1971) in "Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition", ed. by B.N. LaDu et al., S. 206-252, Baltimore
- (4) J.R. Gillette et al. (1972) Annual Rev. Pharmacol 12, 57
- (5) V. Ullrich (1972) Angew. Chem. 84, 689
- (6) V. Ullrich (1977) Arzneim.-Forsch. / Drug Res. 27 (II), 1821
- (7) D.A. Haugen et al. (1975) J. Biol. Chem. 250, 3567
- (8) A.F. Welton et al. (1975) J. Biol. Chem. 250, 5631
- (9) V. Ullrich (1977) in "Microsomes and Drug Oxidations" ed. by V. Ullrich et al., S. 192-201, Oxford

2. Die experimentelle Methode

Die Wechselzahl, englisch "turnover number", gibt das Verhältnis des pro Zeiteinheit umgesetzten Substrats zu den aktiven Enzymmolekülen an. Dieses Verhältnis hat analog zu der spezifischen Aktivität eines Enzyms die Bedeutung einer molaren oder molekularen Aktivität des Enzyms: pro Zeiteinheit werden von einem Mol oder einem Molekül des Enzyms der Wechselzahl entsprechend viele Substrat-Mole oder -Moleküle umgesetzt. Die Wechselzahl kann unabhängig von einem theoretischen Modell des Mechanismus der Katalyse bestimmt werden, wenn man nur die Zahl der aktiven Enzymmoleküle kennt. Häufig ist die eingesetzte Stoffmenge Enzym bekannt, und man nimmt an, daß die gesamte Menge des eingesetzten Enzyms für die Katalyse zur Verfügung steht.

Die Wechselzahl beruht auf der Zahl der "aktiven Enzymmoleküle"; dies soll an Hand zweier Typen der Enzymhemmung illustriert werden: bei der kompetitiven Hemmung werden im Katalysezyklus konkurrierende Wege eröffnet mit der Folge einer verringerten Produktrate; es sind jedoch alle Enzymmoleküle aktiv in dem Sinne, daß alle in den Zyklus eintreten, aber ihre Verweildauer im Zyklus hat sich im Mittel erhöht, und dies drückt sich in einer verringerten Produktrate und damit einer kleineren Wechselzahl aus. In dem anderen Fall der nicht-kompetitiven Hemmung wird ein Teil der Enzymmoleküle "inaktiviert"; der andere Teil, die aktiven Moleküle, durchlaufen den Zyklus unbeeinflusst, so daß das Verhältnis der Produktrate zu den aktiven Enzymmolekülen unberührt bleibt. Man kann die Wechselzahl daher auch als Indikator für Veränderungen im Ablauf des enzymatischen Zyklus ansehen.

Die Bestimmung der Wechselzahl setzt die Bestimmung der jeweiligen aktiven Menge des Enzyms voraus. Man trifft also dort auf eine Grenze, wo man diese Menge nicht oder nur näherungsweise angeben kann, sei es, weil das Molekular-

gewicht der Enzyme oder der aktiven Einheiten nicht bekannt ist, sei es, daß die Enzymmenge nur zu einem unbekannten Teil aktiv ist.

Ein anderer Zugang zu der Wechselzahl führt über die kinetische Bedeutung der Wechselzahl als der mittleren "Umlaufgeschwindigkeit" der Enzymmoleküle im Katalysezyklus. Diese "Umlaufgeschwindigkeit" hängt nun unmittelbar von den kinetischen Parametern des Enzymsystems ab, so daß man mit Kenntnis der Kinetik des Zyklus auch die Wechselzahl des Systems kennt. Dies ist insofern nicht trivial als in die Bestimmung der Kinetik des Systems die aktive Menge des Enzyms nicht eingeht (siehe Abschnitt 5.3); die "kinetische" Wechselzahl ist also unabhängig von der Zahl der aktiven Enzymmoleküle - ihre Bestimmung setzt allerdings die kinetische Analyse des Enzymsystems voraus. Ausgehend von den einzelnen Reaktionsschritten des Systems liegt die Bedeutung der Wechselzahl darin, daß sie das kinetische Verhalten des Enzymzyklus in einer Größe zusammenfaßt.

An dieser Stelle ist ein kurzer Hinweis auf unterschiedliche Verwendungen des Begriffs "Kinetik" notwendig. In der Enzymforschung bezeichnet der Begriff "Kinetik", "Enzymkinetik" durchweg die Variation der enzymatischen Aktivität in Abhängigkeit von Substrat-, Cosubstrat- oder einer Effekorkonzentration, wobei sich das Enzymsystem jeweils im Gleichgewicht mit den "äußeren" Parametern befindet (steady state); der Begriff "Kinetik" bezieht sich hier also auf die Variation des steady state des Enzymsystems, der sich aus den jeweiligen äußeren Parametern wie der Temperatur, dem pH-Wert oder den bereits genannten ergibt. Dementsprechend bezeichnet der Begriff "Anfangskinetik" die enzymatische Aktivität unmittelbar zu Beginn der Reaktion, wo der Wert der äußeren Parameter noch nicht durch die enzymatische Reaktion beeinflusst wurde (und damit bereits zu einem neuen steady state geführt hätte).

In dieser Arbeit wird der Begriff "Kinetik" im Sinne der Reaktionskinetik einer - chemischen - Reaktion verwendet; so wird unter der "Kinetik des Enzymsystems" die Kinetik der einzelnen Reaktionsschritte des Systems verstanden. Um die verschiedene Verwendung des Kinetikbegriffs möglichst auseinanderzuhalten, soll der Begriff "Enzymkinetik" für die übliche Verwendung dieses Begriffs vorbehalten bleiben; in dieser Arbeit wird also im Unterschied zur Enzymkinetik von der Kinetik einer Reaktion eines (Enzym-) Systems gesprochen. In diesem Sinne schließt die Kinetik eines Enzymsystems die "Enzymkinetik" als den Spezialfall des steady state ein.

Ebenso wird der Begriff "Anfangskinetik" hier nicht in dem Sinne der "Enzymkinetik" verwendet; unter der Anfangskinetik wird in dieser Arbeit die Phase im Ablauf der enzymatischen Reaktion verstanden, in der sich das Enzymsystem nach dem Start der Reaktion noch nicht im steady state befindet (siehe auch den folgenden Abschnitt!).

2.1 Die Methode: die Messung der Anfangskinetik

Relaxation und Anfangskinetik

Eine Methode, die kinetischen Parameter des Enzymsystems zu finden, besteht darin, die "Anfangskinetik" des Enzymsystems zu messen. Die kinetischen Parameter eines Systems bestimmen sein Relaxationsverhalten^{*)}; umgekehrt kann man mit bestimmten Voraussetzungen aus der Analyse des Relaxationsverhaltens eines Systems seine kinetischen Parameter ermitteln. Für ein Enzymsystem gilt dieser Sachverhalt analog: ausgehend von dem Start der enzymatischen Reaktion relaxiert das Enzymsystem in den Zustand gleichmäßiger Aktivität, das stationäre Gleichgewicht ("steady state") des Systems.

^{*)} Vorausgesetzt wird, daß das System einen eindeutigen Gleichgewichtszustand besitzt, den es nicht "von selbst" verläßt (entsprechend für das stationäre Gleichgewicht).

Die Relaxation eines Enzymsystems von einem - beliebigen - Anfangszustand in einen definierten stationären Gleichgewichtszustand wollen wir im folgenden "Anfangskinetik" des Systems nennen, im Unterschied zu dem Verhalten im stationären Gleichgewicht.

Die kinetische Analyse des Enzymsystems mit Hilfe der Anfangskinetik stellt einen Sonderfall der Untersuchung chemischer Reaktionen mit Hilfe der Relaxationskinetik dar, wobei das Enzymsystem ein vergleichsweise komplexes System ist.

Die Anfangskinetik des Cytochrom P-450-Systems

Im folgenden wird die Methode beschrieben, mit der die Anfangskinetik des Enzymsystems des Cytochrom P-450 gemessen wurde.

Die Methode beruht auf der photoreversiblen Hemmung des Cytochroms P-450 durch Kohlenmonoxid. In Gegenwart von Kohlenmonoxid und Sauerstoff wird ein gewisser Anteil des reduzierten Cytochroms P-450 durch Kohlenmonoxid gehemmt. Kohlenmonoxid bildet kompetitiv zum Sauerstoff mit dem zweiwertigen Eisen des Cytochroms einen Fe(II)-CO Komplex, der sich durch seine starke Absorption bei 450 nm auszeichnet (und zu dem Namen P-450 geführt hat). Dieser Kohlenmonoxid-Komplex ist photodissoziierbar: intensives Licht der Wellenlänge 450 nm bewirkt die Photolyse des Fe(II)-CO Komplexes und setzt das zweiwertige Eisen für eine Sauerstoffanlagerung frei; dieser Vorgang resultiert in einer vermehrten Aktivität des Enzyms, die Hemmung kann praktisch vollständig aufgehoben werden. Die photochemische Dissoziation der Eisen-Kohlenmonoxid-Verbindung, von HALDANE und SMITH Ende des 19. Jahrhunderts entdeckt, und von O. WARBURG und seinen Mitarbeitern ausgiebig untersucht, bildet die Grundlage des "photochemischen Wirkungsspektrums" der eisenhaltigen Cytochrome (1) : abhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes zeigt sich die photochemische Wirkung in der Reakti-

vierung des durch Kohlenmonoxid gehemmten Cytochroms. Aus der photochemischen Wirkung läßt sich eine Lichtempfindlichkeit des Kohlenmonoxid-Cytochrom-Komplexes ableiten; die Lichtempfindlichkeit ist proportional zur molaren Extinktion des Eisen-Kohlenmonoxid-Komplexes (1):

$$L(\lambda) = \frac{\varphi}{z} \varepsilon(\lambda)$$

wobei φ für die photochemische Ausbeute und z für die Geschwindigkeitskonstante des spontanen Zerfalls des Eisen-Monoxid-Komplexes steht. Dieser theoretisch abgeleitete Zusammenhang zwischen dem Wirkungsspektrum bzw. der Lichtempfindlichkeit und dem Extinktionsspektrum wurde von WARBURG dazu benutzt, aus der experimentell ermittelten Lichtempfindlichkeit die molare Extinktion verschiedener Cytochrome der "sauerstoffübertragenden Fermente" zu bestimmen.

Für das Cytochrom P-450 hat der Sachverhalt, daß das photochemische Wirkungsspektrum das Absorptionsspektrum des aktiven Cytochroms reproduziert, eine besondere Bedeutung: wegen des ausgezeichneten Absorptionsspektrums des Cytochroms kann anhand des Wirkungsspektrums einer enzymatischen Reaktion das Cytochrom P-450 als aktives Enzym identifiziert werden (2).

Die photochemische Wirkung beruht für die Cytochrome, die einen Eisen-Kohlenmonoxid-Komplex bilden, also darauf, die spontane Spaltung des Komplexes zu vergrößern. Im Dunkeln findet keine photochemische Spaltung statt, und das System stellt sich - nach einer Bestrahlung mit Licht - wieder in den Zustand ein, der durch die spontane Zufallskonstante des Eisen-Kohlenmonoxid-Komplexes bestimmt ist (und natürlich auch durch die Kinetik aller anderen Schritte, die wir hierbei aber nicht betrachten müssen).

Die reversible Hemmung des Cytochroms P-450 durch Kohlenmonoxid hat dreierlei Konsequenzen:

erstens ergibt sich für die durch Kohlenmonoxid gehemmten Cytochrommoleküle eine einheitliche Position im Reaktionszyklus, so kann eine große Zahl der Enzymmoleküle zeitlich korreliert werden; sie stellen den Ausgangszustand zur Messung der Anfangskinetik dar;

zweitens ist die Dauer des "photoaktivierten" Zustands des Systems durch die Dauer der Bestrahlung definiert und kann auf diese Weise beliebig variiert werden;

drittens: wie sich aus Punkt eins und zwei ergibt, läßt sich das Enzymsystem durch An- und Abschalten des Lichtes in einen Zustand hoher und niedriger Aktivität "schalten"; diesen Vorgang kann man - im Prinzip - beliebig oft wiederholen, wobei das Enzymsystem jeweils vom Dunkel- in den Hellzustand und wieder in den Dunkelzustand relaxiert.

Nachweis der Kinetik

Mit der Beschreibung eines Anfangs- und Endzustands des Systems sind die Randbedingungen der Anfangskinetik festgelegt. Zum Nachweis des kinetischen Verhaltens des Enzymsystems wurde ein Produkt des Cumarinmetabolismus, das 7-Hydroxycumarin, benutzt. Indem die Kinetik über die enzymatische Aktivität verfolgt wird, ist die Analyse von vornherein auf die aktiven Enzymmoleküle beschränkt; Cumarin scheint darüber hinaus nur von einer relativ kleinen und vermutlich um so homogenen Gruppe der Cytochrom P-450 Moleküle umgesetzt zu werden, worauf die vergleichsweise geringe spezifische Aktivität der Cumarinhydroxylase und das schwach ausgeprägte Substratbindungsspektrum mit einer hohen spektralen Dissoziationskonstanten hindeuten (3). Das Produkt 7-Hydroxy-Cumarin, "Umbelliferon" genannt, läßt sich auf Grund seiner starken Fluoreszenz bereits in geringsten Konzentrationen (10^{-12} mol/dm³) nachweisen und erlaubt somit, kleinste Aktivitäten zu messen.

2.2 Das Meßverfahren

Die flash-photolysis Experimente schränken die Messung der Produktfluoreszenz in einer bestimmten Weise ein: Umbelliferon fluoresziert genau in dem Wellenlängenbereich, der für die Photolyse des P-450-CO Komplexes benötigt wird, den Bereich um 450 nm. Da sich die Produktfluoreszenz spektral nicht von dem Blitzlicht trennen läßt, kann das Produkt nicht während der Dauer des Blitzlichtes gemessen werden. Damit ergibt sich ein Meßverfahren, das in Abb. 2-1 schematisch dargestellt ist.

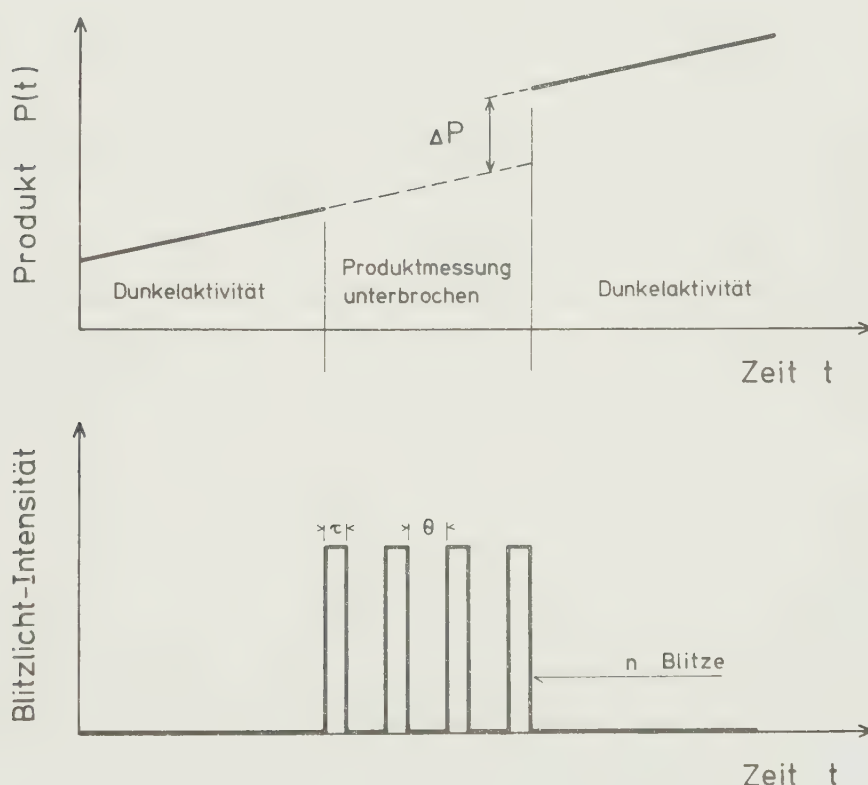


Abb. 2-1 : Schematisches Diagramm des Meßverfahrens.

Das Diagramm illustriert die Bestimmung des Produktzuwachses ΔP (Darstellung oben) als Folge einer mehrfachen Bestrahlung (Darstellung unten); τ : Dauer einer Bestrahlung; θ : Dunkelzeit zwischen je zwei Bestrahlungen.

Der untere Teil der Abbildung illustriert den Ablauf der Bestrahlung: die Probe wird von einer Anzahl von Blitzen gleicher Intensität bestrahlt; die n Blitze derselben Dauer τ folgen jeweils nach einer Dunkelzeit ϑ aufeinander. Synchron dazu zeigt der obere Teil der Abbildung die Produktmenge im enzymatischen Ansatz als Funktion der Zeit: die Aktivität im Dunkeln, die Dunkelaktivität, ist durch die leichte Steigung der Geraden gekennzeichnet, die die geringe und konstante Zunahme des Produkts anzeigt. Während der Bestrahlung der Probe ist die Messung des Produktes unterbrochen, was die gestrichelte Extrapolation der Dunkelaktivität andeutet. Nach der Bestrahlung zeigt die Probe wieder die alte Dunkelaktivität, jedoch versetzt um den Betrag ΔP . Der so definierte Produktzuwachs ΔP wird allein durch die Bestrahlung der Probe erzeugt; unabhängig davon, wie die Bestrahlung zeitlich verteilt ist, führt sie jeweils zu einer erhöhten Aktivität des Enzymsystems - dies ergibt sich unmittelbar aus der Feststellung, die oben unter Punkt 3 (Seite 10) aufgeführt ist. Der Produktzuwachs ΔP nach einer Folge von "Blitzen" ist im allgemeinen eine Funktion der Parameter der Bestrahlung, wie der Blitzdauer τ , der Dunkelzeit ϑ und der Anzahl der Blitze n *).

$$\Delta P = \Delta P(\tau, \vartheta, n) \quad (2.1)$$

Wird die Dunkelzeit zwischen zwei Blitzen so lang gewählt, daß das Enzymsystem wieder seinen Ausgangszustand, den steady state im Dunkeln, einnehmen kann, so ist das Ergebnis der n Blitze unabhängig von der Dunkelzeit zwischen den Blitzen und gleich dem n -fachen des Einzelergebnisses

*) Natürlich ist ΔP auch eine Funktion der Intensität des bestrahlten Lichtes; diese Abhängigkeit interessiert hier jedoch nicht - das Licht wird lediglich als "Schalter" benutzt, der zwei stationäre Zustände des Enzymsystems definiert.

$$\Delta P(\tau, \nu, n) = n \cdot \Delta P(\tau) ; \quad \nu \text{ "groß"} \quad (2.2)$$

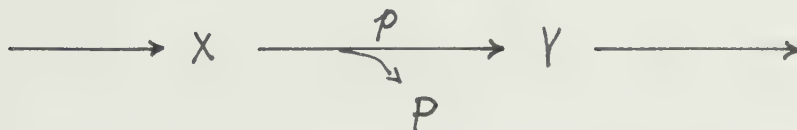
wobei die Bezeichnung $\Delta P(\tau)$ als Kurzschreibweise für $\Delta P(\tau, n = 1) (\nu \rightarrow \infty)$ eingeführt wird.

2.3 Zusammenhang von Anfangskinetik und Produktzuwachs

Dieses hier beschriebene Meßverfahren läßt sich als "intermittierendes" Verfahren zur Bestimmung der Anfangskinetik kennzeichnen: die Bestrahlung der Probe unterbricht jeweils die Messung des enzymatischen Produktes, das Ergebnis der Bestrahlung zeigt sich erst pauschal im Nachhinein; indem die Dauer des aktiven Zustandes einschließlich der Relaxation dorthin durch die Dauer der Bestrahlung bestimmt wird, wird die Anfangskinetik des Enzymsystems punktweise durch Variationen der "Blitz"dauer abgetastet. Die Menge des Produktes einer enzymatischen Reaktion, das innerhalb einer Zeitspanne Δt gebildet wird, stellt eine Integration über die enzymatische Aktivität in der betreffenden Zeitspanne Δt dar. Mit der Messung des enzymatischen Produktes erhält man also die integrierte Form der enzymatischen Kinetik; im stationären Zustand eines Enzymsystems ergibt sich so die simple Form eines linearen Produktzuwachses, dessen "Steigung" gleich der - stationären - Aktivität des Enzymsystems ist.

Wegen des intermittierenden Verfahrens besteht der Produktzuwachs $\Delta P(\tau)$ nach einer Bestrahlung der Dauer τ aus der Summe zweier Terme. Der eine Term stellt die Integration über die Anfangskinetik des Enzymsystems in der Zeitspanne τ dar; der andere Term ergibt sich aus der Integration über das Relaxieren des Systems in den stationären Dunkelzustand. Bezeichnen wir mit X die Stufe im Reaktionszyklus, aus der das Produkt - mit der Zufallskonstante p des Kom-

plexes X - abgespalten wird



so finden wir die Anfangskinetik des Systems in der zeitlichen Variation der Menge der Enzymmoleküle in der Reaktionsstufe X realisiert, wobei wir die zwei Funktionen $X^h(t)$ und $X^d(t)$ für den Reaktionsverlauf im Hellen (h) und im Dunkeln (d) unterscheiden. Der oben geschilderte Sachverhalt für den Produktzuwachs kann damit quantitativ formuliert werden

$$\Delta P(\tau) = \int_0^{\tau} p \cdot \Delta X^h(t) dt + \int_0^{\tau} p \cdot \Delta X^d(t) dt \quad (2.3)$$

Gleichung (2.3) gilt für den Fall einer einmaligen Bestrahlung, nach der das Enzymsystem in den stationären Dunkelzustand relaxiert ($\tau \rightarrow \infty$). Entsprechend der Definition des Produktzuwachses wird in den Integralen nur die Differenz der Funktion $X(t)$ zu ihrem Dunkelgleichgewichtswert X_{GL}^d berücksichtigt

$$\begin{aligned} \Delta X^h(t) &= X^h(t) - X_{GL}^d \\ \Delta X^d(t) &= X^d(t) - X_{GL}^d \end{aligned}$$

Gleichung (2.3) läßt sich sofort auf den Fall mehrfacher Bestrahlung erweitern

$$\Delta P(\tau, \tau^d, n) = \sum_{i=1}^n \left\{ \int_0^{\tau} p \Delta X^h(t) dt + \int_0^{\tau^d} p \Delta X^d(t) dt \right\}^{(i)} \quad (2.4)$$

Hier zeigt der Index i den von Belichtung zu Belichtung geänderten Anfangszustand des Enzymsystems an: das System erreicht innerhalb der Dunkelzeit τ^d im allgemeinen nicht seinen stationären Dunkelzustand, und der Produktzuwachs bei jeder einzelnen Belichtung wird von der "Vorgeschichte" des Systems abhängig. Aus dem Verlauf des Produktzuwachses

$\Delta P(\tau, \vartheta, n)$ lassen sich also die kinetischen Parameter des Enzymsystems gewinnen, wenn man eine "geeignete" Funktion für den Komplex X zu Grunde legt. Funktionen, die als "geeignet" angesehen werden können, zu finden, ist Aufgabe einer kinetischen Analyse des Enzymsystems; sie wird in Kapitel 5 diskutiert.

2.4 Literatur

- (1) O. Warburg (1948) "Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten", 2. Aufl., Verlag Dr. W. Saenger, Berlin
- (2) R.W. Estabrook, D.Y. Cooper, O. Rosenthal (1963) Biochem. Z. 338, 741
- (3) F. Kratz, Hj. Staudinger (1968) Hoppe-Seylers's Z. Physiol. Chem. 349, 455

3. Experimentelles

3.1 Die Meßapparatur

Aus der experimentellen Aufgabenstellung ergibt sich ein apparativer Aufbau, der zwei Funktionen, "Blitzlicht-Photolyse" und Fluorimetrie - jeweils an derselben Probe - integriert. Im ganzen besteht die Apparatur aus den fünf Komponenten, die das Blockschema der Abb. 3-1 zeigt: eine Lichtquelle hoher Intensität, ein elektromagnetischer Verschuß, ein Fluorimeter, die Signalverarbeitung und -registrierung und ein elektronisches Steuergerät.

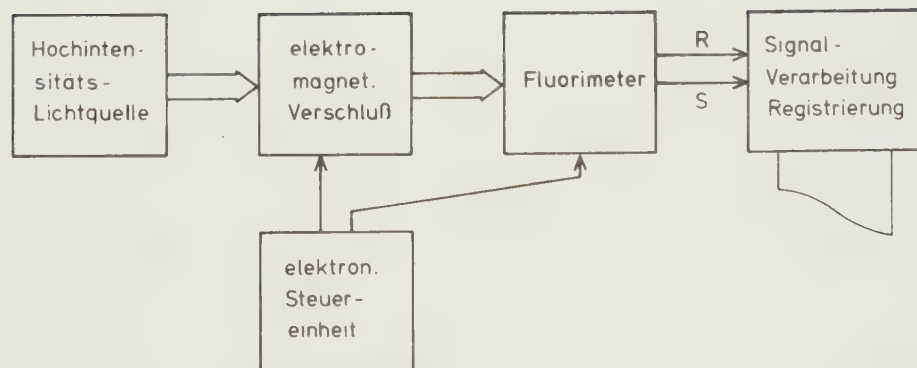


Abb. 3-1 : Blockschema der Meßapparatur.

Die einzelnen Komponenten sind im Text beschrieben. Das Fluorimeter liefert ein Referenzsignal (R) und ein Proben-signal (S) - siehe auch Abb. 3-2.

"Flash Photolysis"

Anders als in der klassischen Form der flash-photolysis Experimente (1), in denen das Relaxieren des Systems nach einem Licht-Blitz verfolgt wird, kommt es bei den Experimenten dieser Arbeit darauf an, den durch die Photolyse erzeugten Zustand des Systems eine bestimmte, in einem weiten Bereich variierbare Zeit aufrecht zu erhalten. Die zeitlich ausgedehnte Photolyse erfordert eine kontinuierlich arbeitende Lichtquelle. Die Apparatur ist mit einer 2,5 kW Xenon-Hochdrucklampe und einem Gittermonochromator, einer kommerziellen Hochintensitätsilluminationsanlage^{*)}, ausgerüstet. Vom Ausgang des Monochromators wird das Licht über einen Lichtleiter an die Probe herangeführt (siehe Abb. 3-2); der Endquerschnitt des Lichtleiters von 4 x 20 mm wurde dem lichten Maß der Probenküvette angepaßt, so daß eine konzentrierte und weitgehend gleichmäßige Bestrahlung der Probe erreicht wird. Ein elektromagnetisch betriebener Photoverschluß^{*)} am Ausgang des Monochromators - zwischen Monochromator und Lichtleiter - begrenzt die Dauer der Lichtpulse, die Bestrahlungszeit τ (siehe Abschnitt 2.2). Der Verschluß wird von einem elektronischen Puls-Generator^{*)} gesteuert. Die Öffnungszeit des Verschlusses läßt sich, bedingt durch die Trägheit der Lamellen, herab bis 10 msec variieren. Die Lichtpulse können n-mal mit einem definierten Zeitintervall wiederholt werden; dabei ist die Häufigkeit und die Länge des Intervalls von der Zählkapazität des Puls-Generators^{*)} bestimmt.

Die Proben wurden mit blauem Licht - zentriert um 450 nm mit einer Halbwertsbreite von 16 nm - bestrahlt, damit waren ultraviolette und infrarote Anteile der Lichtquelle abgetrennt. Die Gesamtintensität der Bande am Monochromatorausgang betrug 50-70 mW, so daß die Proben ungefähr mit 20-30 mW verteilt auf eine Fläche von 0,8 cm², das ist 25-40 mW/cm², bestrahlt wurden.

*) Die Hersteller und Detail-Spezifikationen der hier erwähnten Geräte werden im Anhang A angegeben.

Die Fluorimetrie

Das zweite Funktionsmerkmal der Apparatur ist der fluorimetrische Nachweis des Produktes der enzymatischen Reaktion. Für die Fluoreszenzmessungen stand ein Gerät mit hoher Nachweisempfindlichkeit, das Modell MPF-3 der Firma Perkin-Elmer^{*)}, zur Verfügung. Der Probenraum des Gerätes wurde modifiziert, um den Lichtleiter aufnehmen zu können. Abb. 3-2 zeigt die Anordnung des Lichtleiters und der Probenküvette. Der Kopf des Lichtleiters befindet sich unmittelbar vor der Küvette, er ist mit dem massiven Probenhalter fest verbunden.

Die Temperatur des Halters läßt sich über einen temperierbaren Kupferblock, auf dem der Küvettenhalter fest steht, regulieren.

Im Strahlengang des Fluoreszenzlichtes wurde ein zweiter elektromagnetisch betriebener Photoverschluß^{*)} angebracht, der im Gegenteil zu dem anderen Verschluß arbeitet; dadurch wird die empfindliche Meßeinrichtung für das Fluoreszenzlicht vor der hohen Intensität des Blitzlichtes gleicher Wellenlänge geschützt. Der zweite Verschluß wird ebenfalls von dem Puls-Generator gesteuert.

Ein wesentlicher Faktor für die Genauigkeit von Fluoreszenzmessungen besteht in der konstanten Intensität des anregenden Lichtes. Das Fluorimeter verwendet eine 150 W-Xenon-Hochdrucklampe^{*)}, deren Leuchtbogen auf den Spalt des "Anregungsmonochromators" abgebildet wird. Diese Anordnung führt prinzipiell zu erheblichen Intensitätsschwankungen der anregenden Spektralbande, die aus der unvermeidbar instabilen Lage des Leuchtbogens resultieren. Die im Fluorimeter vorhandene Einrichtung einer Referenzbildung kompensiert die Intensitätsschwankungen des Anregungslichtes nur sehr un-

^{*)} siehe Anhang A

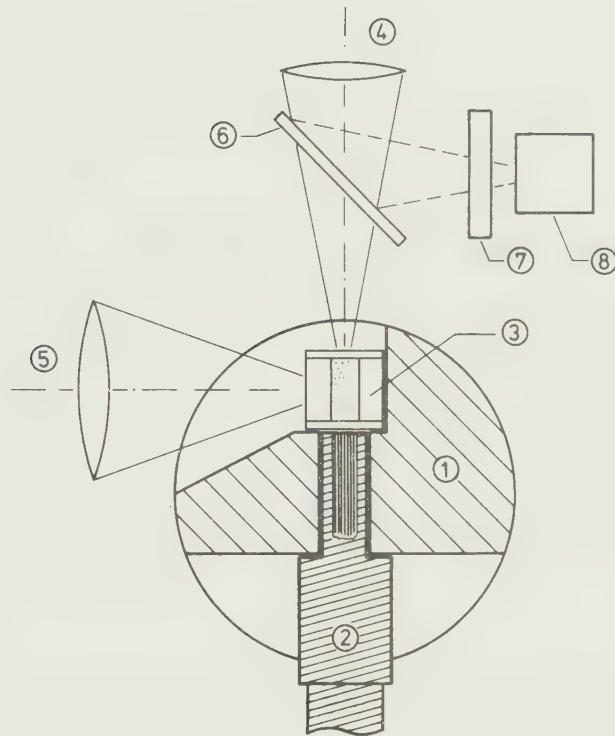


Abb. 3-2 :

Küvettenhalter und Strahlengang

Die Abbildung zeigt die Anordnung von Küvettenhalter (1), Lichtleiter (2) und Küvette (3). Der Querschnitt des Lichtleiterbündels vor der Küvette ist mit den angedeuteten Lichtleitfasern angegeben. Der Probenraum beschränkt sich auf punktierten Teil der Küvette.

Die Emission wird senkrecht zur Excitation gemessen; die Öffnungswinkel werden durch die Sammellinse (5) bzw. die Fokuslinse (4) begrenzt.

Ein Quarzscheibchen (6) zweigt einen Teil des anregenden Lichtes zur Referenzmessung ab; (7) Schutzfilter, (8) Fluoreszenzstandard.

vollständig; durch eine neugestaltete Signalverarbeitung und einen neuen Lampentypus^{*)} konnte die relative Konstanz der anregenden Spektralbande um etwa eine Größenordnung verbessert werden.

Aus dem anregenden Licht wird kurz vor der Probenküvette ein Teil ausgeblendet und zur Referenzmessung verwendet (siehe Abb. 3-2). Es erwies sich als günstig, das ausgeblendete Licht auf einen Kunststoffblock mit einem eingeschmolzenen fluoreszierenden Stoff (Rhodamin) zu lenken und die Fluoreszenz des Blockes zu messen; ein Filter^{*)} schützt den Referenz-Photomultiplier vor den Lichtpulsen der Blitzlicht-Photolyse.

Da für die Experimente eine hohe Zeitauflösung nicht erforderlich war, wurde auf eine aufwendige Referenzbildung, wie sie z.B. in Absorptionsspektrometern verwendet wird, verzichtet; stattdessen wurde ein digitales Voltmeter^{*)}, mit dem sich zwei Gleichstromsignale dividieren lassen, verwendet; die Zeitauflösung des Gerätes - bedingt durch den Digitalisierungsprozeß - beträgt 0,5 sec, weitaus genug für die Messungen hier. Das auf diese Weise korrigierte Probensignal wurde nach einer Digital-Analog-Umwandlung auf einem x-t-Schreiber^{*)} aufgezeichnet. Die Digital-Analog-Umwandlung bietet zudem auf einfache Weise die Möglichkeit einer Spreizung des Signals und gleichzeitiger "Nullpunktsunterdrückung", indem jeweils nur die variierenden Ziffern des Signals umgewandelt werden und führende Ziffern unberücksichtigt bleiben.

Das Anregungs- bzw. Extinktionsspektrum von Umbelliferon hängt stark vom pH-Wert der Lösung ab; bei pH 8, dem pH-Wert des enzymatischen Ansatzes, liegt das Maximum des Extinktionsspektrums bei 360 nm; das Spektrum wird allerdings von der ebenfalls stark fluoreszierenden Substanz NADPH, die sich

^{*)} siehe Anhang A

in relativ hoher Konzentration, ca. 10^{-4} mol/l, im Ansatz befindet, beeinflusst:

das effektive Maximum der Anregung erscheint bei 380 nm, ein Wert, der auch von KERÉKJÁRTÓ und ULLRICH angegeben wird (2/3). Die Anwesenheit von Cumarin beeinflusst die Fluoreszenz von Umbelliferon nicht; bei der Anregungswellenlänge von 380 nm absorbiert Cumarin zudem kaum noch. Die Emission wurde im Maximum der Fluoreszenz von Umbelliferon bei 450 nm gemessen. Die Bandbreite wurde in beiden Strahlengängen, der Excitation und der Emission jeweils auf 10 nm eingestellt.

3.2 Mikrosomen und enzymatische Ansätze

Bei verschiedenen Tierspezies wird Cumarin in sehr unterschiedlicher Weise metabolisiert. Frühere Untersuchungen geben an, daß Umbelliferon, ein Cumarin-Metabolit, besonders stark beim Kaninchen aber auch beim Rind und Hammel gebildet wird (4). Da es keinen universitätseigenen Tierstall gab, der uns mit Tieren hätte versorgen können, griffen wir auf Schweine und Rinder aus dem öffentlichen Schlachthof und auf Kaninchen aus einer privaten Zucht zurück. Die Lebermikrosomen von Schwein, Rind und Kaninchen waren im wesentlichen gleich aktiv in der Hydroxilierung von Cumarin zu Umbelliferon. Wegen der besseren Verfügbarkeit der Tiere wurden für die Experimente, die hier berichtet werden, Kaninchen verwendet.

Die Mikrosomen wurden aus den Lebern nach dem üblichen Verfahren der differentiellen Zentrifugation (5) in der Version von LU und LEVIN (6) hergestellt. Stücke der schlachtfrisch eisgekühlten Leber werden im Verhältnis 1 : 3 (g/g) mit Puffer A^{*)} versetzt und 2 x 30 sec in einem Rührgerät^{**)}

*) siehe nächste Seite

***) siehe Anhang A

bei 6.000 U/min zerkleinert. Das Leberhomogenat wird 30 min bei 10.000 g zentrifugiert; der Überstand wird durch ein Leinentuch filtriert und 90 min bei 100.000 g zentrifugiert. Das Sediment der Ultrazentrifugation wird in Puffer B^{*)} aufgenommen ("gewaschen") und abermals 60 min mit 100.000 g zentrifugiert. Das Sediment der zweiten Ultrazentrifugation wird in einem Glycerin-Puffer^{*)} mit einer Proteinkonzentration von ca. 50 mg/ml aufgenommen; diese Mikrosomensuspension wird in Portionen von je 1 ml in kleine verschließbare Plastikgefäße gefüllt und bei -20°C aufbewahrt - während des ganzen Präparationsganges wird die Temperatur der Mikrosomen zwischen 0°C und 4°C gehalten. Die kleinen Portionen können unabhängig nacheinander für die Untersuchungen aufgebraucht werden. Die Verwendung des Glycerin-Puffers erwies sich als wesentlich nicht nur für die Erhaltung der enzymatischen Aktivität der Mikrosomen, sondern auch für gute Suspensionseigenschaften der Mikrosomen im enzymatischen Ansatz (siehe Kap. 4).

Die Mikrosomenpräparation wurde durch ihren Gehalt an Protein und an spektroskopisch nachweisbarem Cytochrom P-450 charakterisiert. Das Protein wurde mit der Biuret-Methode nach BEISENHERZ bestimmt (8). Jeweils 0,2 mg - 0,5 mg Mikrosomenprotein wird auf 1 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und durch Zugabe von 0,2 ml Trichloressigsäure (3 mol/l) gefällt und abzentrifugiert. Das Sediment wird mit 0,5 ml gebrauchsfertiger Biuret-Reagenz-Lösung aufgerührt, mit destilliertem Wasser auf 1 ml aufgefüllt und

*) Puffer A: 0.05 mol/l TRIS, 1.15% KCL, 10^{-3} mol/l EDTA,
Puffer B: 0.05 mol/l TRIS, 1.15% KCL, 10^{-2} mol/l EDTA,
beide Puffer eingestellt auf pH 7.4.

Glycerin-Puffer: Kalium-Phosphat-Puffer (0.01 mol/l) enthält 20% (vol.) Glycerin; der pH 7.7 wird mit den glycerin-haltigen Komponenten eingestellt.

geschüttelt, bis das Sediment gelöst bzw. emulgiert ist. Nach 30 min wird die Extinktion der Probe bei 540 nm gegen den Leerwert gemessen, ein Teil der Probe wird durch Zugabe von 50 µl einer KCN-Lösung (80 mg/ml) entfärbt; der Extinktionswert der entfärbten Probe, gemessen gegen den entfärbten Leerwert, wird von ersterem Extinktionswert subtrahiert; die Differenz ist proportional zur Extinktion der Protein-Kupfer-Komplexe. Das Verfahren wird mit bekannten Lösungen von Rinderserum-Albumin geeicht^{*)}.

Der "spektrale Gehalt" an mikrosomalem Cytochrom P-450 wurde nach dem von OMURA und SATO angegebenen Verfahren bestimmt (7); es wird die Extinktion des Kohlenmonoxidkomplexes des Cytochroms - ein Fe(II)-CO Komplex - gegen das reduzierte Cytochrom - Fe(II) - gemessen; für die Differenz der jeweiligen Extinktion bei 450 nm und 490 nm ($\Delta E_{450-490}$) geben OMURA und SATO eine spezifische Extinktion an:

$$\Delta \epsilon_{450-490} = 91 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}.$$

Die Küvetten enthalten in 3 ml Puffer (siehe OMURA und SATO) ca. 3 mg Mikrosomenprotein. Die Proben-Küvette wurde mit Kohlenmonoxid begast, anschließend wurden Proben-Küvette und Referenz-Küvette mit Dithionit reduziert. Das Differenzspektrum wurde auf einem "Aminco-Chance" Spektralphotometer^{**)}, dessen Basislinie vorher korrigiert worden war, aufgezeichnet.

Die enzymatischen Ansätze der Aktivitätsbestimmungen und der "flash photolysis"-Experimente enthalten die wesentlichen Komponenten in Konzentrationen, die sich aus früheren Untersuchungen ergeben hatten (2/9). Die Ansätze enthielten

^{*)} Dieses Verfahren wurde aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Gießen übernommen.

^{**)} siehe Anhang A

in einem Gesamtvolumen von 1,04 ml 1 ml einer Cumarin-Puffer-Lösung (10^{-4} mol/l Cumarin, 0,1 mol/l TRIS-HCl-Puffer pH 8,0), 20 μ l einer NADPH-MgCl₂-Lösung (10^{-2} mol/l NADPH, 0,25 mol/l Mg Cl₂) und 20 μ l der Mikrosomensuspension (ca. 1 mg Protein insgesamt). Bezogen auf das Gesamtvolumen enthielt der Ansatz also $9,6 \times 10^{-5}$ mol/l Cumarin, $1,9 \times 10^{-4}$ mol/l NADPH, $4,8 \times 10^{-4}$ mol/l MgCl₂. Die Mikrosomensuspension wurde mit dem Glycerin-Puffer (siehe oben) so verdünnt, daß 20 μ l der Suspension ca. 1 mg Mikrosomenprotein enthielten, das entspricht ca. 50 mg/ml Protein in der Stammsuspension.

Alle fluorimetrischen Messungen der enzymatischen Aktivität wurden in temperierbaren Fluoreszenz-Küvetten^{*)} bei 25°C durchgeführt. Zur Bestimmung der Aktivität wurde die Enzymreaktion durch Zugabe der NADPH-Lösung gestartet und kontinuierlich fluorimetrisch verfolgt.

Die Gasgemische aus Sauerstoff, Kohlenmonoxid und Stickstoff für die "flash photolysis"-Experimente wurden in einer Gasmischanlage jeweils in einem gewissen Vorrat hergestellt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Partialdruck des jeweiligen Gases, gemessen in Prozent vom Gesamtdruck. Die Ansätze wurden in den Küvetten mit Hilfe einer feinen Injektionsnadel begast, wobei ein Ansatz pro Minute von 30-60 kleinen Gasbläschen durchspült wurde. Der Puffer eines Ansatzes wurde jeweils drei Minuten lang begast, nach Zugabe der NADPH-Lösung und der Mikrosomensuspension wurde der Ansatz nochmals zwei Minuten begast, anschließend wurde die Küvette verschlossen und in den Probenraum des Fluorimeters gebracht.

Die enzymatische Absolutaktivität wurde durch Zugabe von 5 μ l oder 10 μ l einer Umbelliferon-Stammlösung zum Ansatz bestimmt. Die Stammlösungen (10^{-4} , 5×10^{-5} und 10^{-5} mol/l)

^{*)} siehe Anhang A

wurden wegen ihrer begrenzten Haltbarkeit etwa wöchentlich erneuert; die Lösungen ließen sich zudem in einfacher Weise durch ihr Extinktionsspektrum kontrollieren. Eine frisch angesetzte Lösung von Umbelliferon in bi-destilliertem Wasser ergibt im Maximum der Absorption bei 323 nm einen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 14.2 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ l cm}^{-1}$, bezogen auf die Extinktion bei 380 nm.

3.3 Literatur

- (1) G. Porter (1969) "Flash photolysis and some of its applications", in: "Les Prix Nobel en 1967", S. 212 - 231, Stockholm
- (2) B. v. Kerékjártó, F. Kratz, Hj. Staudinger (1964) Biochem. Z. 339, 460
- (3) V. Ullrich, P. Weber (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353 1171
- (4) P.-Ch. Fink, B. v. Kerékjártó (1966) Biochem. Z. 345, 272
- (5) H. Remmer et al. (1967), in: "Methods of Enzymology", ed. by S.P. Colowick et al., vol. 10, S. 703-708, Academic Press, New York
- (6) A.Y.H. Lu, W. Levin (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1334
- (7) T. Omura, R. Sato (1967), in: "Methods of Enzymology", vol. 10, S. 556-561, Hrsg. s. (5)
- (8) G. Beisenherz et al. (1953) Z. Naturforsch. 8b, 555
- (9) F. Kratz, Hj. Staudinger (1965) Biochem. Z. 343, 27

4. Meßergebnisse

4.1 Allgemeine Untersuchungen

Die Mikrosomen

Die Experimente zur Bestimmung der Anfangskinetik des Lebermonooxygenasesystems wurden mit insgesamt sechs Mikrosomenpräparationen durchgeführt. Die Präparationen stammen jeweils von der Leber eines Tieres; sie werden hier mit KLM I bis KLM VI bezeichnet. In Tabelle 4-1 sind spezifische Merkmale der einzelnen Präparationen zusammengestellt: der spezifische Gehalt an Cytochrom P-450 wie auch die Proteinbestimmung wurde jeweils an der ein oder zwei Tage alten Präparation bestimmt, die spezifische Aktivität der Cumarin-7-Hydroxylase meist erst zu einem späteren Zeitpunkt. Die Präparationen verloren auch während der Aufbewahrung bei -20°C nach und nach ihre enzymatische Aktivität, wie das Beispiel der Präparation KLM III illustriert: die Aktivität der zwei Monate alten Mikrosomen nahmen in den folgenden zwei Monaten um etwa 40% ab (Tab. 4-2)*).

enzymatische Aktivität nach	59 d	121 d	
KLM III	154 ± 7	94 ± 5	$\frac{\text{pmol U.}}{\text{min} \cdot (\text{mg Prot.})}$

Tabelle 4-2: Die enzymatische Aktivität nimmt mit dem Alter der Präparation ab
(Mittelwert aus 5 Messungen).

*) Es zeigt sich, daß der Verlust an enzymatischer Aktivität keinen Einfluß auf das kinetische Verhalten des Enzymsystems hat; wir gehen darauf noch einmal am Schluß des Abschnitts ein.

Präparation	<u>P-450 Gehalt</u> nmol/mg Prot.	<u>enzymatische Aktivität</u> pmol U. min ⁻¹ (mg Pr.) ⁻¹	<u>Protein im Ansatz</u> mg
KLM I	1.1 ± 0.1	185 ± 7	0.82
KLM II	1.5	173 ± 2	0.76
KLM III	1.8	154 ± 7	0.74
KLM IV	1.3	124 ± 19	0.74
KLM V	1.2	79	0.79
KLM VI	1.3	106	0.80

Tabelle 4-1: Spezifische Eigenschaften der Mikrosomenpräparationen KLM I bis KLM VI. Ist eine Standardabweichung angegeben, so ist der angegebene Wert ein Mittelwert aus drei bzw. fünf Messungen.

Stabilität der Ansätze

Eine wesentliche Voraussetzung der empfindlichen fluorimetrischen Messungen ist die Stabilität der enzymatischen Ansätze in den Küvetten für die Dauer eines Meßvorganges. Die Suspension der Mikrosomen stellt für Licht ein grob inhomogenes Medium dar, dessen Streueigenschaften von der jeweiligen Verteilung der Mikrosomenpartikel abhängen; es kommt daher darauf an, daß die enzymatischen Ansätze während einer Messung nicht gestört werden, womit sich vor allem das Rühren oder Schütteln der Ansätze verbietet; Störungen durch Konvektionsströmungen werden mit Hilfe von temperierbaren Küvetten vermieden. Die Tabelle 4-3 zeigt die enzymatische Aktivität einiger Präparationen in je drei aufeinanderfolgenden Zeitabschnitten; die Aktivitätswerte sind auf den Wert des zweiten Zeitabschnittes bezogen, der gleich 100 gesetzt wurde. Nach einer Phase der Stabilisierung des Ansatzes unmittelbar nach dem Start der enzymatischen Reaktion folgt ein Abschnitt weitgehend konstanter, maximaler Aktivität; die Aktivität nimmt allerdings mit fortschreitender Zeit wieder leicht ab, was sich bereits im dritten Zeitabschnitt andeutet.

Während die Anfangsphase im wesentlichen auf der Temperatureinstellung des Küvetteninhaltes beruht, deren Sollwert nach etwa ein bis zwei Minuten erreicht ist, wird der Abfall der Aktivität des Ansatzes durch das allmähliche Sedimentieren der Mikrosomenpartikel bedingt. Die Sedimentation erfolgt umso schneller, je schlechter sich die Mikrosomen suspendieren lassen; Ansätze mit gefriergetrockneten und wieder suspendierten Mikrosomen zeigen einen deutlich rascheren Abfall der Aktivität (innerhalb derselben Zeitspanne) als Ansätze mit Mikrosomen, die in 20-prozentigem Glycerin-Puffer eingefroren waren (Tab. 4-3). Dem entspricht, daß die Ansätze mit gefriergetrockneten Mikrosomen nach etwa 20 min deutlich einen Bodensatz in der Küvette erkennen ließen. Gefriergetrocknete Mikrosomen erwiesen sich somit als unbrauchbar für die flash photolysis-Experimente; das Aufbewahren der Mikro-

Zeitabschnitt	0 - 2 min	4 - 10 min	10 - 13 min	15 - 21 min
KLM II	97 $\pm$ 2	100	98.5 $\pm$ 0.9	-
KLM III	95 $\pm$ 1	100	99.0 $\pm$ 0.6	-
KLM IV	98 $\pm$ 2	100	100.7 $\pm$ 0.7	-
KLM I ^{*)}	-	100	97 $\pm$ 1	93 $\pm$ 2
KLM II ^{*)}	-	100	90 $\pm$ 3	-
KLM III ^{*)}	100 $\pm$ 1	100	96 $\pm$ 2	-

Tabelle 4-3: Enzymatische Aktivität im ruhenden Ansatz in aufeinander folgenden Zeitabschnitten. Die Aktivitäten wurden auf diejenigen des zweiten Zeitabschnitts normiert (= 100). Die Angaben sind Mittelwerte aus drei bzw. fünf Versuchsreihen.

*) Mikrosomen der jeweiligen Präparation, die gefriergetrocknet aufbewahrt wurden.

somen in dem Glycerin-Puffer verbessert offensichtlich die Suspensionseigenschaften der Mikrosomen, so daß Ansätze mit diesen Mikrosomen für eine Zeitspanne von 10-15 min als stabil angesehen werden können. Die Zeit für die Stabilisierung des Ansatzes abgerechnet bleiben etwa 10 min, die ein Meßvorgang beanspruchen darf. Dies bedeutet, daß die Bestrahlungsdauer einer Probe und bei Mehrfachbestrahlungen auch die Dunkelzeit und die Anzahl der Wiederholungen durch die zeitlich begrenzte Stabilität der Ansätze eingeschränkt werden.

Der relative Produktzuwachs

Zur experimentellen Bestimmung des Produktzuwachses in Abhängigkeit von der Dauer der Bestrahlung der Probe, der "Hellzeit", wurden die Proben jeweils zweimal nach folgendem Schema bestrahlt:

1. Temperierung der Küvette: 2 min
2. Bestrahlung 60 sec : $\Delta P(60)$
3. Dunkelphase 2 min
4. a) Bestrahlung der Dauer τ : $\Delta P(\tau)$
b) n-fache Wiederholung jeweils nach einer Dunkelzeit τ_d : $\Delta P(\tau, \tau_d, n)$
5. Dunkelphase 2 min
6. Kalibrierung der Umbelliferon-Fluoreszenz (nach Bedarf).

Auf diese Weise erhält man für jede Probe einen Referenzwert $\Delta P(60)$, auf den der Meßwert, $\Delta P(\tau)$, bezogen werden kann: einmal werden damit Einflüsse experimenteller Herkunft - die jeweilige Arbeitsstellung des Fluorimeters, Schwankungen in der pipettierten Mikrosomenmenge - eliminiert, zum anderen ist der auf die "interne" Referenz bezogene Produktzuwachs unabhängig von der Anzahl der aktiven Enzyme. Durch die Größe

$$\Delta P(\tau) / \Delta P(60) = \tilde{\Delta P}(\tau) \quad (4.1a)$$

oder allgemein

$$\Delta P(\tau, \nu, n) / \Delta P(60) = \tilde{\Delta P}(\tau, \nu, n) \quad (4.1b)$$

ist der relative Produktzuwachs als Funktion der Hellzeit τ , der Dunkelzeit ν und der Anzahl der "Blitze" n definiert. Der relative Produktzuwachs $\tilde{\Delta P}(\tau)$ hat auf Grund seiner Definition einen ausgezeichneten Wert, nämlich

$$\tilde{\Delta P}(\tau = 60s) \equiv 1. \quad (4.2)$$

Reproduzierbarkeit von ΔP

Die Gleichung (4.2) liefert zugleich ein Kriterium für die Reproduzierbarkeit der Meßwerte in einem Ansatz. Die Reproduzierbarkeit der Meßwerte kann sowohl von möglichen irreversiblen Nebenwirkungen der Bestrahlung beeinträchtigt werden als auch durch eine zu geringe Stabilität des Ansatzes, die im vorigen Abschnitt diskutiert wurde. Eine gute Reproduzierbarkeit im selben Ansatz zeigt sich darin, daß Gl. (4.2) von den Meßwerten gut erfüllt wird; eine gute Reproduzierbarkeit schließt insbesondere die Voraussetzungen des stabilen Ansatzes für die Dauer der Messung mit ein.

Ansätze von den einzelnen Mikrosomen-Präparationen wurden auf die Reproduzierbarkeit hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-4 zusammengestellt. Für verschiedene Präparationen ist dort der Produktzuwachs nach einer einminütigen Hellzeit, bezogen auf den Produktzuwachs nach einer ebenfalls einminütigen Bestrahlung, also $\tilde{\Delta P}(60)$ gemäß Gl. (4.1), angegeben. Ansätze von tiefgefrorenen Mikrosomen ergaben ein $\tilde{\Delta P}(60)$, das Gl. (4.2) gut erfüllt; die maximale Abweichung betrug 2%, wobei $\tilde{\Delta P}(60)$ in der Tendenz leicht

KLM II	KLM III	KLM IV	KLM I*	KLM III*
1.007 ± 0.012	1.001 ± 0.014	1.021 ± 0.007	0.95 ± 0.01	0.97 ± 0.10

Tabelle 4-4: Der relative Produktzuwachs $\tilde{\Delta}P(60)$ bei Ansätzen mit tiefgefrorenen und gefriergetrockneten (*) Mikrosomen. In allen Ansätzen war das CO : O₂ Verhältnis 5 : 1 (im Gasraum).

oberhalb des Wertes 1 liegt. Ansätze von gefriergetrockneten Mikrosomen ergaben dagegen Werte für $\tilde{\Delta}P(60)$, die deutlich unterhalb des Wertes 1 liegen. Im Einklang mit den Ergebnissen der Tabelle 4-3 ist für diese Mikrosomen die Voraussetzung des zeitlich stabilen Ansatzes offensichtlich nicht erfüllt.

Die gute Reproduzierbarkeit in den Ansätzen von tiefgefrorenen Mikrosomen bildet die Grundlage dafür, daß die Meßergebnisse der flash photolysis-Experimente gemäß Gl. (4.1) als relative Werte, die sich auf eine für jeden einzelnen Ansatz gemessene Referenzgröße beziehen, dargestellt werden können.

Die Dunkelaktivität

Der guten Reproduzierbarkeit der flash photolysis-Ergebnisse steht das Verhalten der Dunkelaktivität der Ansätze vor und nach einer Bestrahlung der Probe gegenüber. Jeweils nach der ersten einminütigen Bestrahlung der Proben nahm die Dunkelaktivität ab, im Mittel um etwa 10%, die folgenden Bestrahlungen der Probe blieben dagegen praktisch ohne Einfluß auf die Dunkelaktivität. Dieser Effekt war gleich für alle Prä-

parationen und ohne erkennbare Abhängigkeit von dem Kohlenstoffmonoxidanteil in den Ansätzen. Tab. 4-6 zeigt die typische Dunkelaktivität (DA) eines Ansatzes in der Folge der Probenbestrahlungen bezogen auf die DA des Ansatzes vor der ersten Bestrahlung der Probe, die gleich 100 gesetzt wurde. Die Werte stellen eine Zusammenfassung von Mittelwerten aus den verschiedenen Meßreihen dar; das Streumaß bezieht sich auf die Streuung der Mittelwerte; die geringe Streuung kennzeichnet deutlich das für alle Meßreihen einheitliche Verhalten der Dunkelaktivität.

Der Produktzuwachs $\Delta P(60)$

Mit der Einführung des relativen Produktzuwachses $\tilde{\Delta P}$ (Gl.(4.1)) erübrigt sich die Bestimmung der absoluten Werte des Produktzuwachses im Prinzip; dennoch sind die absoluten Werte von Interesse, einmal um die verschiedenen Präparationen zu vergleichen, zum anderen um den Haltbarkeitszustand einer Mikrosomenpräparation zu kontrollieren. Für beide Zwecke eignen sich die absoluten Werte des jeweiligen Produktzuwachses nach 60 sec Bestrahlung, die jeweilige Referenzgröße $\Delta P(60)$ also, gleichermaßen. Die absoluten Werte $\Delta P(60)$ sind in Tab. 4-5 für einige Meßreihen^{*)} zusammengestellt.

Dunkelaktivität		
vor erster Bestrahlung	nach erster Bestrahlung	nach zweiter Bestrahlung
100	90 ± 3	89 ± 4

Tabelle 4-6: Die Dunkelaktivität vor und nach den Bestrahlungen der Probe.

Die Dunkelaktivität ist in Relation zum anfänglichen Wert (gleich 100) angegeben. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte aus 11 Meßreihen. Die geringen Standardabweichungen zeigen das einheitliche Verhalten der DA bei allen Meßreihen an.

^{*)}

*) Die Meßreihen sind in Tab. 4-5 zusammengestellt.

Die Zahlen stellen jeweils den Mittelwert der Werte von $\Delta P(60)$ dar, die an verschiedenen Tagen im Laufe der jeweiligen Meßreihe gefunden wurden; das Streumaß ergibt die Streuung der Werte $\Delta P(60)$ über alle Meßtage an; innerhalb einer Meßreihe ließ sich - wenn überhaupt - nur eine geringe, systematische Abnahme der Werte $\Delta P(60)$ feststellen; die Werte der einzelnen Tage sind eher statistisch verteilt. Lediglich in Versuch c) ergaben sich zu Beginn der Meßreihe höhere Werte für $\Delta P(60)$, die allmählich abnahmen und gegen Ende der Meßreihe auf einen niederen Wert einpendelten. Diese Änderung von $\Delta P(60)$ wirkte sich jedoch auf den relativen Produktzuwachs $\tilde{P}(\tau)$, soweit erkennbar, nicht aus (siehe dazu Abb. 4-3).

CO : O ₂		9 : 1	5 : 1	2 : 1	1 : 1
KLM	I	86 ± 4	99 ± 3		
KLM	III	58 ± 2	83 ± 5 a) 80 ± 3 b)		80 ± 9
KLM	IV		130 → 102 ± 4 c) 90 ± 5 d)	98 ± 6 e)	
KLM	VI	45 ± 2 f)			

Tabelle 4-5: Absoluter Produktzuwachs nach einer Bestrahlung von 60 s für einige Präparationen bei verschiedenen Verhältnissen von CO : O₂.

Der Produktzuwachs $\Delta P(60)$ ist in $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ angegeben. Einzelne Meßreihen sind mit a) - f) gekennzeichnet (siehe Tab. 4-7). Die zwei Werte der Meßreihe c) bezeichnen den Wert von ΔP zu Beginn und gegen Ende der Meßreihe.

Die Lichtwirkung

Die Aktivität eines Ansatzes während der Bestrahlung wird einmal wesentlich durch das Verhältnis von Kohlenmonoxid zu Sauerstoff im Ansatz und zum anderen durch die Lichtempfindlichkeit der Mikrosomen, d.h. des Kohlenmonoxid-bindenden Cytochroms P-450, bestimmt. Die Lichtempfindlichkeit stellt - unabhängig von der Kohlenstoffmonoxid-Konzentration im Ansatz - eine charakteristische Größe für die jeweiligen Mikrosomen dar. Aus den flash photolysis-Experimenten läßt sich die Lichtempfindlichkeit nicht unmittelbar entnehmen. Unmittelbar aus den Experimenten ergibt sich jedoch das Verhältnis des Produktzuwachses nach einminütiger Bestrahlung $\Delta P(60)$ zur Dunkelaktivität $DA^{*)}$

$$\Delta P(60) / DA.$$

Um einen dimensionslosen Ausdruck zu erhalten, wird die Dunkelaktivität durch den Produktzuwachs je Minute im Dunkeln ersetzt:

$$\frac{\Delta P(60)}{DA \cdot 60s} = LW \quad (4.3)$$

Der Ausdruck in Gl. (4.3) soll in Anlehnung an die Lichtempfindlichkeit "Lichtwirkung" (LW) genannt werden. Die so definierte Lichtwirkung ist eine Funktion der Lichtempfindlichkeit der Mikrosomen; darüber hinaus hängt sie jedoch auch von dem $CO : O_2$ Verhältnis im Ansatz und von der Intensität des bestrahlenden Lichtes ab. Für die Meßreihen in Tab. 4-5 wurden die Werte der Lichtwirkung gemäß Gl. (4.3) ermittelt. Tabelle 4-7 zeigt jeweils den Mittelwert der Lichtwirkung innerhalb einer Meßreihe und die Standardabweichung s. Die starke Streuung der Lichtwirkungswerte - s beträgt etwa 10% vom Mittelwert - wird vor allem durch die Streuung der Dunkelaktivität hervorgerufen. Die Lichtwirkung an den einzelnen Meßtagen streute statisch, eine Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität der Mikrosomen ist nicht erkennbar. Wie erwartet, variiert die Lichtwirkung

*) Der Ausdruck hat die Dimension Zeit.

CO : O ₂	9 : 1	5 : 1	2 : 1	1 : 1
KLM I	13.3 ± 1.2	9.9 ± 0.8		
KLM III	17.2 ± 2.4	10.4 ± 0.9 a) 9.1 ± 0.8 b)		2.7 ± 0.2
KLM IV		6.3 ± 0.5 c) 5.8 ± 0.6 d)	3.1 ± 0.4 e)	
KLM VI	15.2 ± 3.0 f)			

Tabelle 4-7: Die Lichtwirkung $\Delta P(60)/60 \cdot DA$ einiger Präparationen bei verschiedenen Verhältnissen von CO : O₂ (im Gasraum).

Die Tabelle ist ebenso wie Tab. 4-5 angeordnet; beiden Tabellen liegen dieselben Meßreihen zu Grunde. Einzelne Meßreihen sind der Übersichtlichkeit halber mit a) bis f) bezeichnet. Bei den Meßreihen d), e) und f) war die Intensität des Blitzlichtes ca. ein Drittel geringer als bei den übrigen Meßreihen.

parallel zu dem Kohlenmonoxidanteil im enzymatischen Ansatz; die Lichtwirkung wächst allerdings nicht proportional zum Kohlenmonoxidgehalt, sondern schwächer. Es fällt auf, daß die Lichtwirkung für die Mikrosomen der Präparation IV deutlich geringer ist als für die Mikrosomen der Präparationen I und III. Eine Verringerung der Intensität des die Probe bestrahlenden Lichtes macht sich dagegen nur geringfügig bemerkbar (Tab. 4-7); das deutet darauf hin, daß die geringere Lichtwirkung bei den Mikrosomen der Präparation IV durch eine kleinere Lichtempfindlichkeit dieser Mikrosomen bedingt ist.

Alterung der Mikrosomen

Das intermittierende Meßverfahren mit dem punkweisen Abtasten der Anfangskinetik (siehe Kap. 3) bringt es mit sich, daß sich eine Meßreihe über mehrere Tage erstreckt, eine Serie von Meßreihen sogar über mehrere Wochen. Die Meßmethode setzt daher voraus, daß die untersuchten Eigenschaften der Mikrosomen bzw. des Enzymsystems zeitlich konstant sind. Insbesondere müssen sich diese Eigenschaften als unabhängig von der kontinuierlichen Abnahme der enzymatischen Aktivität der Mikrosomen erweisen.

Die Untersuchung der Meßreihen ergibt, daß sich eine Abhängigkeit der Meßwerte sowohl vom Alter der Mikrosomen als auch von der spezifischen Aktivität nicht feststellen läßt. Wir haben bereits bemerkt, daß die Lichtwirkung statistisch streut und keine Korrelation mit dem Alter bzw. der Aktivität zeigt; dasselbe gilt für das Verhalten der Dunkelaktivität vor und nach Bestrahlung der Probe. Auch die Meßwerte der Anfangskinetik selbst lassen keinen Einfluß des Mikrosomenalters^{*)} oder der spezifischen Aktivität erkennen^{**)}.

*) Nachmessungen zu einem späteren Zeitpunkt reproduzieren frühere Meßwerte wie die Doppelmessungen in Abb. 4-3a und Abb. 4-4a zeigen.

***) Die Meßreihe c), Tab. 4-5, enthält Meßwerte aus Ansätzen mit unterschiedlicher spezifischer Aktivität (siehe Abb. 4-2

Es zeigte sich, daß die Mikrosomen solange verwendbar waren, d.h. die eben genannten Eigenschaften besaßen, wie die enzymatischen Ansätze das Kriterium nach Gl. (4.2) erfüllten. Damit erwies sich Gl. (4.2) als das Hauptkriterium, das die Eignung der Mikrosomen für unsere Untersuchungen anzeigte.

4.2 Meßreihen: Anfangskinetik und steady state

Gemäß der in Kapitel 2 eingeführten Methode ergibt sich aus der Funktion $\Delta P(\tau, \tau^d, n)$ die Anfangskinetik des Enzymsystems, der Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasen. Auf der Grundlage dieser Methode wurden die flash photolysis-Experimente durchgeführt; gemessen wurde der Produktzuwachs $\Delta P(\tau, \tau^d, n)$ als Funktion der Hellzeit τ , wobei in den verschiedenen Meßreihen die experimentellen Parameter, das Verhältnis der Kohlenstoffmonoxid- zu der Sauerstoffkonzentration im enzymatischen Ansatz, die Anzahl n der Blitze und die Dunkelzeit τ^d zwischen ihnen variiert wurden.

Die einzelnen Meßreihen werden jeweils durch den relativen Produktzuwachs $\tilde{\Delta P}(\tau, \tau^d, n)$ gemäß der Definition im vorigen Abschnitt dargestellt (Gl. (4.1)).

Entsprechend der Variation des jeweiligen Parameters lassen sich die Meßreihen in vier Gruppen klassifizieren:

- die Meßreihen, bei denen der Produktzuwachs jeweils nach einer einzigen Bestrahlung bestimmt wurde:
 $\tilde{\Delta P}(\tau), n = 1$. In dieser Meßreihe wurde die Bestrahlungszeit τ im Bereich von 0 bis 80 sec variiert;
- die Meßreihen, in denen das $\text{CO} : \text{O}_2$ Verhältnis variiert wurde: $\tilde{\Delta P}(\tau, \tau^d, n), \tau^d = 5 \text{ s}, n = 10$;
 $[\text{CO}] : [\text{O}_2] = 1/2/5/9$;

- die Meßreihen, in denen die Anzahl der "flashes" variiert: $\tilde{\Delta P}(\tau, \nu, n)$, $\nu = 5$ s; $n = 1/5/10$;
- die Meßreihen schließlich, in denen die Dunkelzeit zwischen den Blitzen variiert wurde: $\tilde{\Delta P}(\tau, \nu, n)$, $n = 5$ oder 10 ; $\nu = 5/10/20$ s.

Die deskriptive Funktion $y(\tau)$

Es zeigt sich, daß in allen Meßreihen der Verlauf des Produktzuwachses als Funktion der Hellzeit recht gut durch eine e-Funktion beschrieben wird, die sich an eine Gerade anschmiegt. Die Werte von $\tilde{\Delta P}(\tau, \nu, n)$ werden von einer Funktion der Form

$$y(\tau) = A \tau + B + C \exp(-\alpha \cdot \tau) \quad (4.4)$$

recht gut repräsentiert. Die Funktion $y(\tau)$ ist in Abb. 4-1 schematisch dargestellt. Die Konstanten A und B beschreiben die Gerade, die sich im stationären Zustand des Enzymsystems ergibt (siehe auch Abb. 4-2). Der e-funktionelle Term beschreibt die Funktion $\tilde{\Delta P}(\tau, \nu, n)$ im Bereich der Anfangskinetik des Enzymsystems, die - in dieser Beschreibung - gemäß der Zeitkonstanten α in den stationären Zustand übergeht. Die Konstante C ergibt sich aus dem Anfangswert der Funktion $y(\tau = 0) = y_0$:

$$C = y(0) - B = y_0 - B,$$

für $y(0) = y_0 = 0$ ist $C = -B$.

Die ausgezogenen Kurven in Abb. 4-2 bis Abb. 4-6 stellen jeweils einen "best fit" der Funktion $y(\tau)$ an die Meßwerte $\tilde{\Delta P}(\tau, \nu, n)$ dar. Aus dem fit ergeben sich die Werte der Konstanten A, B, C und α bzw. A, B, y_0 und α nebst ihrer statistischen Absicherung^{*)}. Der Wert der reduzierten χ^2 -

*) Bei den Meßreihen mit $n = 5/10$ gibt es keine Meßwerte im linearen Bereich ($\tau > 5$ s). In diesem Fall wurde die Steigung A vorgegeben (siehe unten), und der "best fit" betrifft nur die freien Parameter B, y_0 (C) und α (A fest).

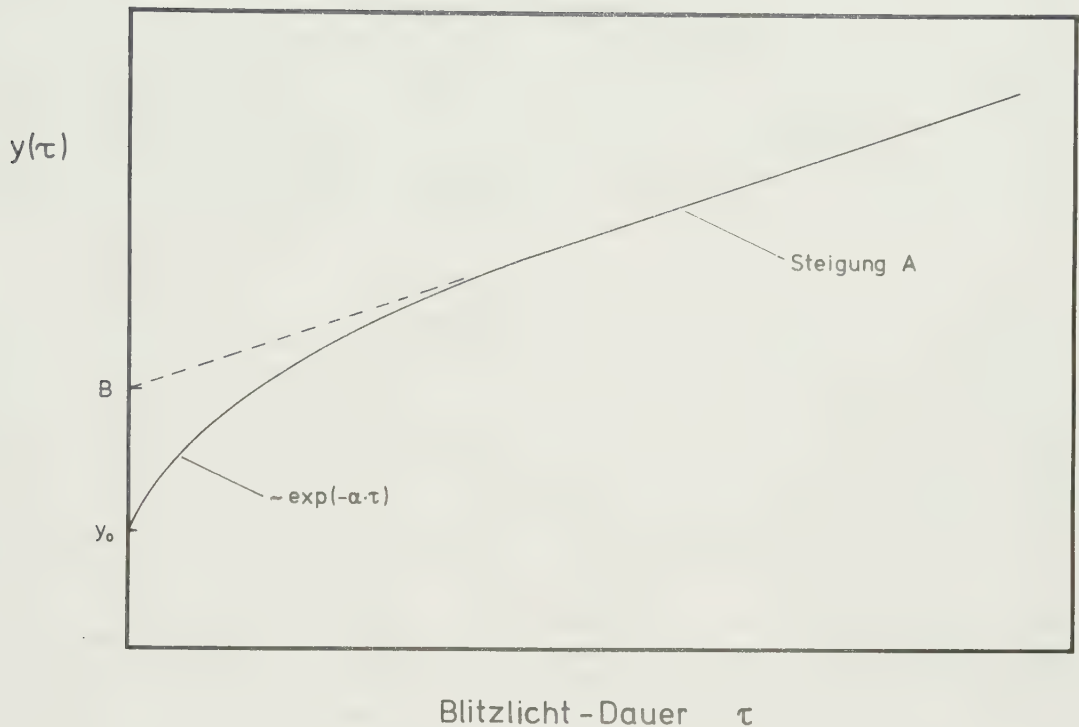


Abb. 4-1: Die deskriptive Funktion $y(\tau)$

Die Abbildung illustriert die Bedeutung der Parameter der Funktion. Die Konstante B ergibt sich graphisch als Extrapolation des linearen Verlaufs für $\tau = 0$.

Funktion, χ^2/ν , ist ein Maß für die Güte des fit^{*)}. Die Werte von χ^2/ν liegen allesamt mit einer Ausnahme unterhalb von 1, woraus man entnehmen kann, daß die Meßwerte durch die beschreibende Funktion (Gl. (4.4)) gut repräsentiert werden.

^{*)} Anpassungsverfahren und Definition der χ^2 -Funktion sind beschrieben in: Ph. R. Bevington, "Data reduction and error analysis for the physical sciences", New York 1969

Anfangskinetik und steady state: $\tilde{\Delta P}(\tau)$

Aus der ersten Gruppe der Meßreihen zeigen Abb. 4-2 und 4-3 die Funktion $\tilde{\Delta P}(\tau)$, $n = 1$ für Hellzeiten τ von 0 bis 80 s bei zwei verschiedenen $\text{CO} : \text{O}_2$ Verhältnissen - 5 : 1 (Abb. 4-2a /4-3a) und 9 : 1 (Abb. 4-2b /4-3b) jeweils im Gasraum. In Abb. 4-2 tritt vor allem die lineare Zunahme des Produktzuwachses $\tilde{\Delta P}(\tau)$ mit zunehmender Hellzeit τ im Bereich grösserer Hellzeiten hervor.

Dieses Verhalten der Funktion $\tilde{\Delta P}(\tau)$ entspricht dem stationären Zustand des Enzymsystems, der sich während der Belichtung nach einer bestimmten Zeit einstellt und zu einer konstanten Aktivität des Systems führt. Der lineare Verlauf des relativen Produktzuwachses $\tilde{\Delta P}(\tau)$ bestätigt weiterhin, daß die oben besprochene "interne" Referenz eine geeignete Normierung für die Meßwerte ΔP darstellt. Die Forderung der Gl. (4.2) wird nicht nur von den einzelnen Messungen an der Stelle $\tau = 60$ s erfüllt, sondern auch von der über alle Messungen im linearen Bereich mittelnden Geraden

$$A \tau + B,$$

dem linearen Anteil der Funktion $y(\tau)$.

$y(\tau = 60)$ ist bis auf kleine - allerdings signifikante - Abweichungen von maximal 2,5% gleich dem Wert 1 gemäß Gl. (4.2) (Tab. 4-8). Da die Werte des relativen Produktzuwachses im linearen Bereich keine systematische Abweichung von der anpassenden Geraden erkennen lassen, wird die Abweichung des Funktionswertes $y(60)$ von dem Wert 1 einem systematischen Fehler im Normierungsverfahren zugeschrieben; die anpassende Funktion erhält daher einen Korrekturfaktor F ,

$$F = y(60). \quad (4.5)$$

Die korrigierte Funktion

$$y_{\text{kor}}(\tau) = y(\tau) / F \quad (4.6)$$

nimmt für $\tau = 60$ s den theoretisch geforderten Wert 1 an. Diese Korrektur ist gleichbedeutend mit einer Erhöhung der Referenzwerte $\Delta P(60)$ um den Faktor F.

In Abb. 4-3 ist der Bereich kleiner Hellzeiten vergrößert dargestellt; hier zeigt sich deutlich in der Funktion $\tilde{\Delta P}(\tau)$ die Anfangskinetik des Enzymsystems. Ein Vergleich mit Abb. 4-1 macht die Bedeutung, den der Parameter B der Funktion $y(\tau)$ für die Anfangskinetik hat, unmittelbar anschaulich. Der Term B resultiert aus dem in der Anfangsphase gegenüber dem steady state vermehrt gebildeten Produkt; der Term B stellt eine Integration dieser vermehrten Produktbildung über die Anfangsphase dar nebst einem Anteil, der sich aus der Dunkel-Relaxation des Enzymsystems im Anschluß an eine Bestrahlung ergibt (siehe Abschnitt 2.3).

Die Abbildungen 4-2 und 4-3 zeigen die Funktion $y(\tau)$ in ihrer jeweils besten Anpassung an die Meßwerte $\tilde{\Delta P}(\tau)$; die Werte der Parameter, die zu dem "best fit" gehören, sind in Tab. 4-8 aufgestellt. Die kleinen χ^2/ν -Werte drücken die gute Repräsentation der Meßwerte durch die angepaßte Funktion aus (siehe oben). Insgesamt sind die Parameterwerte bei der Meßreihe mit der Präparation KLM IV eindeutiger bestimmt als bei der anderen Meßreihe (KLM VI); dieser Unterschied resultiert aus der größeren Streuung der Meßwerte in letzterer Meßreihe. Für beide Meßreihen hat der Parameter y_0 einen Wert deutlich größer als Null. Der Korrekturfaktor für die Meßreihe KLM IV ist geringfügig - jedoch signifikant - größer als eins; die Parameterwerte in dieser und auch in den folgenden Tabellen sind gemäß Gl. (4.6) korrigierte Werte, wobei sich F aus der unkorrigierten Funktion ergibt (Gl. (4.5)).

Seite 43 oben:

Abb. 4-2a: Meßreihe $\tilde{\Delta P}(\tau)$ im gesamten Bereich;
CO : O₂ = 5 : 1,
Präparation KLM IV

Seite 43 unten:

Abb. 4-2b: Meßreihe $\tilde{\Delta P}(\tau)$ im gesamten Bereich;
CO : O₂ = 9 : 1,
Präparation KLM VI

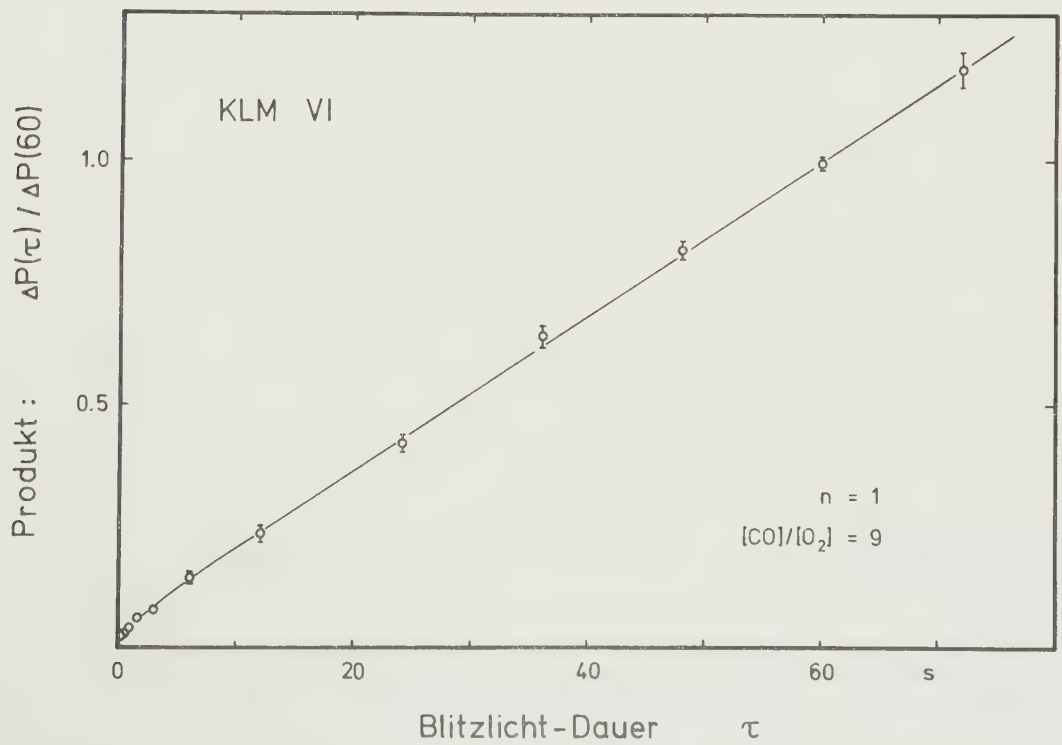
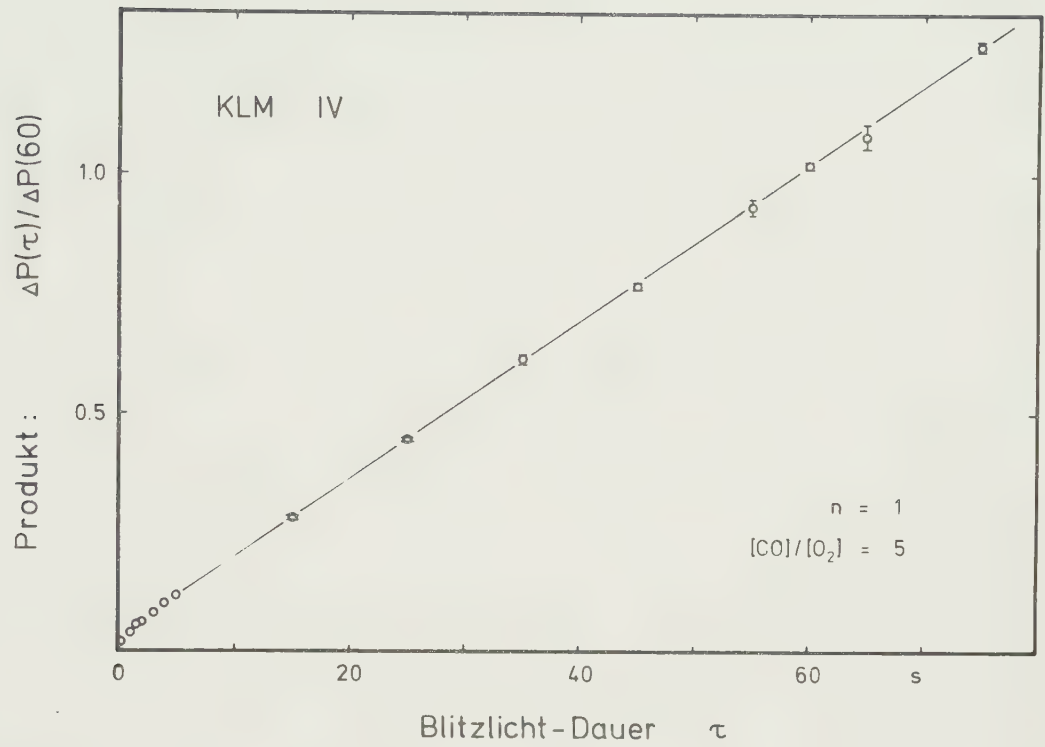
Seite 44 oben:

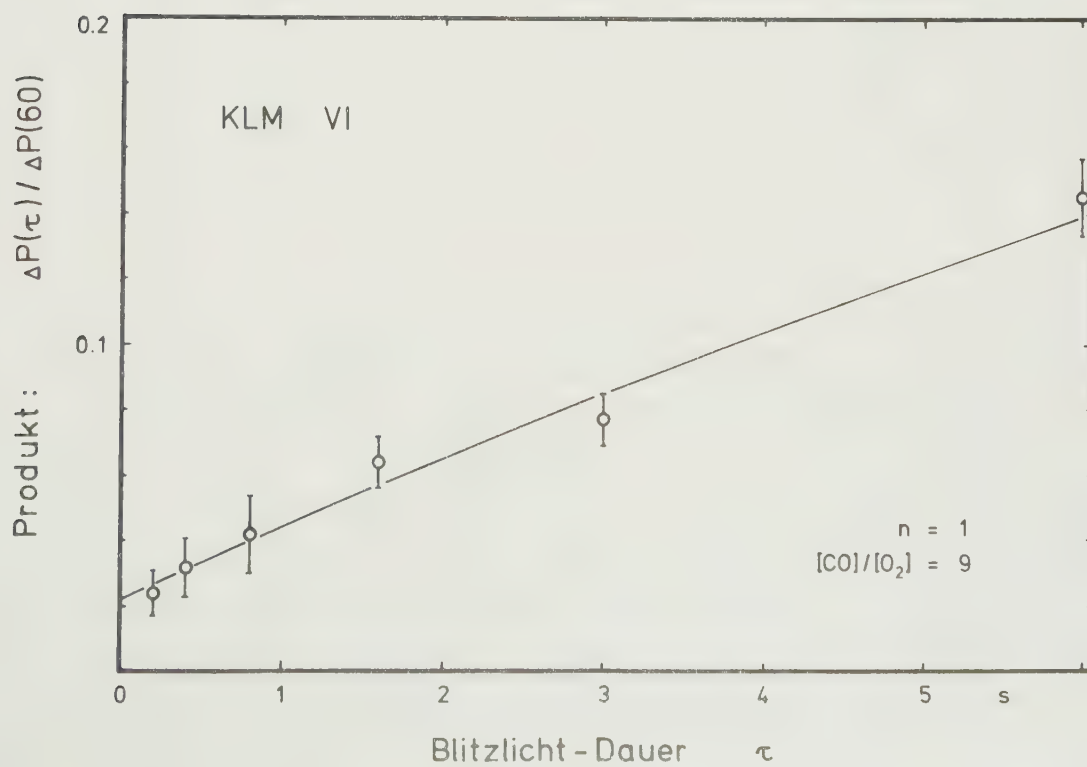
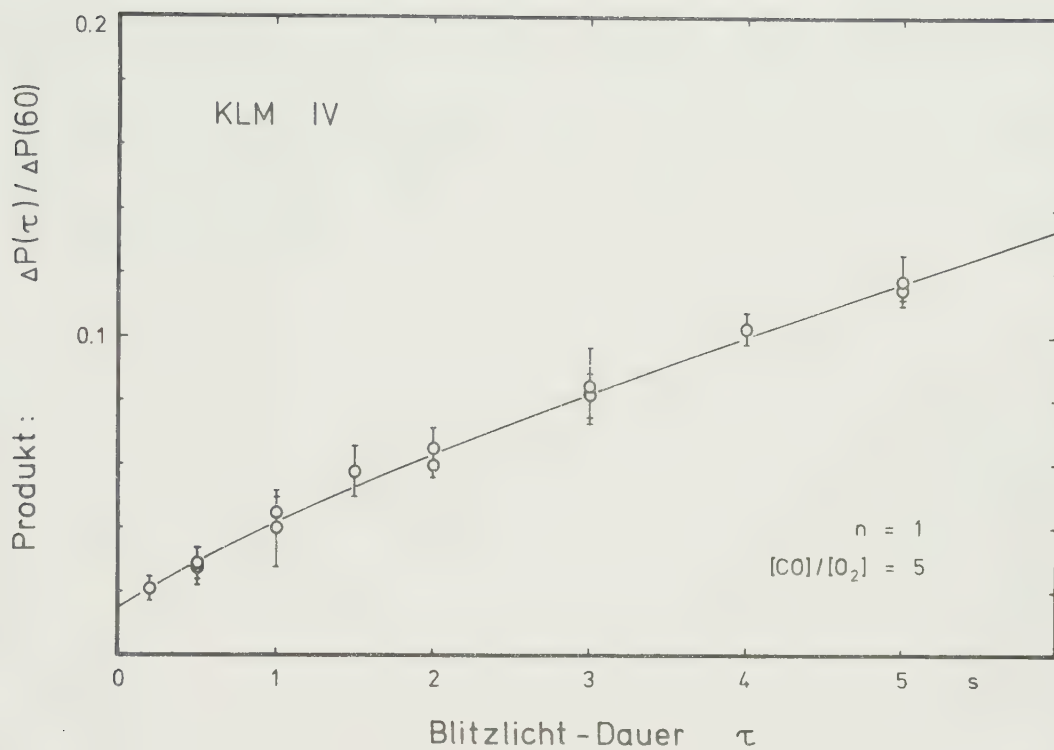
Abb. 4-3a: Meßreihe $\tilde{\Delta P}(\tau)$ im Bereich der Anfangsphase
 (vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 4-2a).

Seite 44 unten:

Abb. 4-3b: Meßreihe $\tilde{\Delta P}(\tau)$ im Bereich der Anfangsphase
 (vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 4-2b).

Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte von je fünf (KLM V)
bzw. drei (KLM VI) Meßwerten, mit deren Streuung (Standard-
abweichung s) und den "best fit" der Funktion $y(\tau)$.





Das CO : O₂ Verhältnis im Ansatz

Unter den spezifischen Bedingungen, die durch die Meßmethode gegeben sind, wird die Kinetik des Enzymsystems wesentlich durch den Anteil des Kohlenmonoxids im enzymatischen Ansatz geprägt. Die Abb. 4-4 zeigt den relativen Produktzuwachs im Bereich der Anfangskinetik des Systems unter verschiedenen CO : O₂ Verhältnissen im Ansatz.

Je größer der Anteil von Kohlenmonoxid im Ansatz ist, desto geringer ist ganz allgemein die Hellaktivität des Ansatzes (Tab. 4-5). In der Darstellung des relativen Produktzuwachses zeigt sich, daß die Anfangskinetik um so ausgeprägter ist, je kleiner das CO : O₂ Verhältnis im Ansatz ist. Eine quantitative Beschreibung der wachsenden Ausprägung der Anfangskinetik erhält man in dem Parameter A der Funktion $y(\tau)$, der "Steigung" des Produktzuwachses ΔP im stationären Bereich; mit abnehmendem CO : O₂ Verhältnis wird auch die Steigung geringer. Wegen der Normierung der Meßreihen sind die Parameter A und B nicht unabhängig voneinander: eine Verringerung der Steigung führt zu einer Vergrößerung von B (vgl. Gl. (4.2) und Abb. 4-1). Die Ausprägung der Anfangskinetik zeigt sich also auch im Parameter B: B ist um so größer, je geringer der CO-Anteil im enzymatischen Ansatz ist (Tab. 4-9); für die anderen Parameter der Funktion $y(\tau)$, y_0 und α , wird die Abhängigkeit vom CO : O₂ Verhältnis nicht deutlich.

Der Einfluß des Kohlenmonoxidanteils auf die Anfangskinetik variiert mit der Präparation: während die Präparation KLM I einen ausgeprägten Unterschied des jeweiligen Produktzuwachses bei dem CO : O₂ Verhältnis 5 : 1 und 9 : 1 ergibt (Abb. 4-4a), zeigt sich dieser Unterschied bei der Präparation KLM III kaum (Abb. 4-4b). Wegen dieses von Präparation zu Präparation variierenden Einflusses des Kohlenmonoxids auf die Kinetik des Systems, lassen sich also nur Messungen an ein und derselben Präparation unmittelbar miteinander vergleichen.

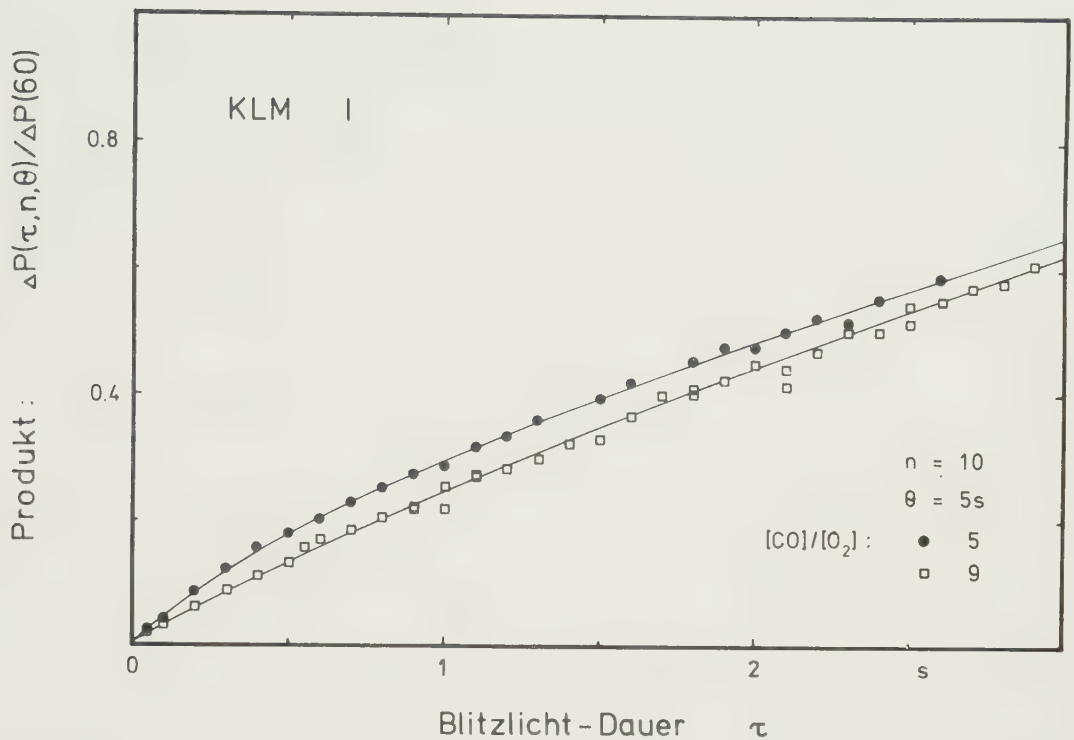
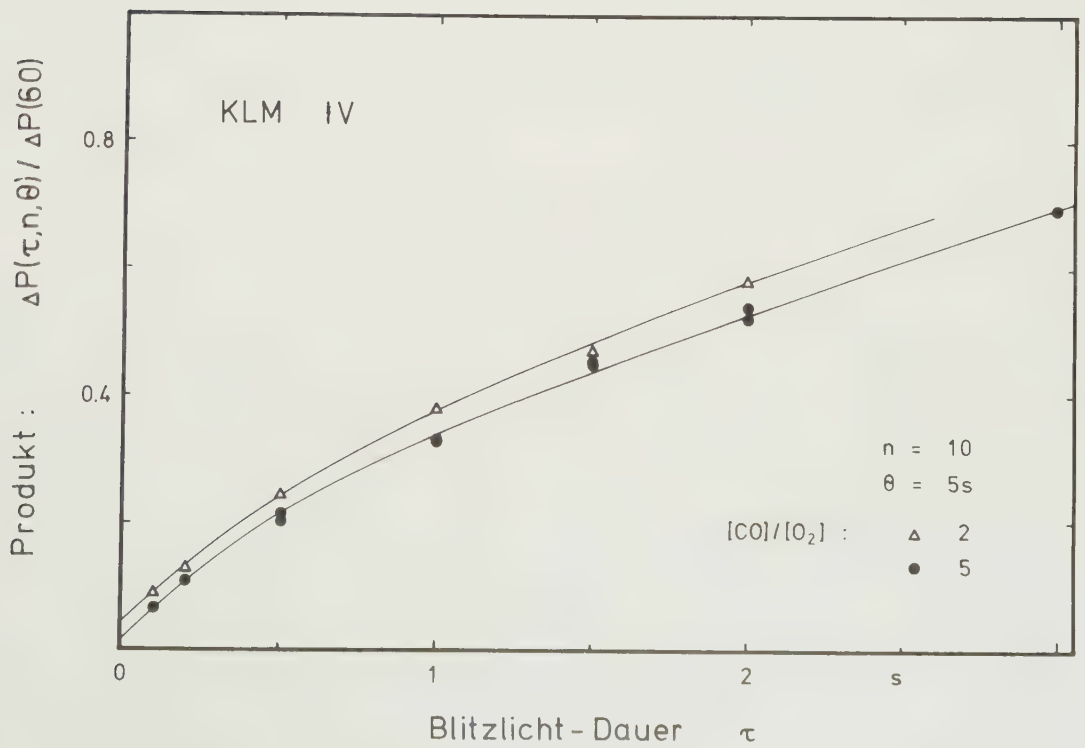
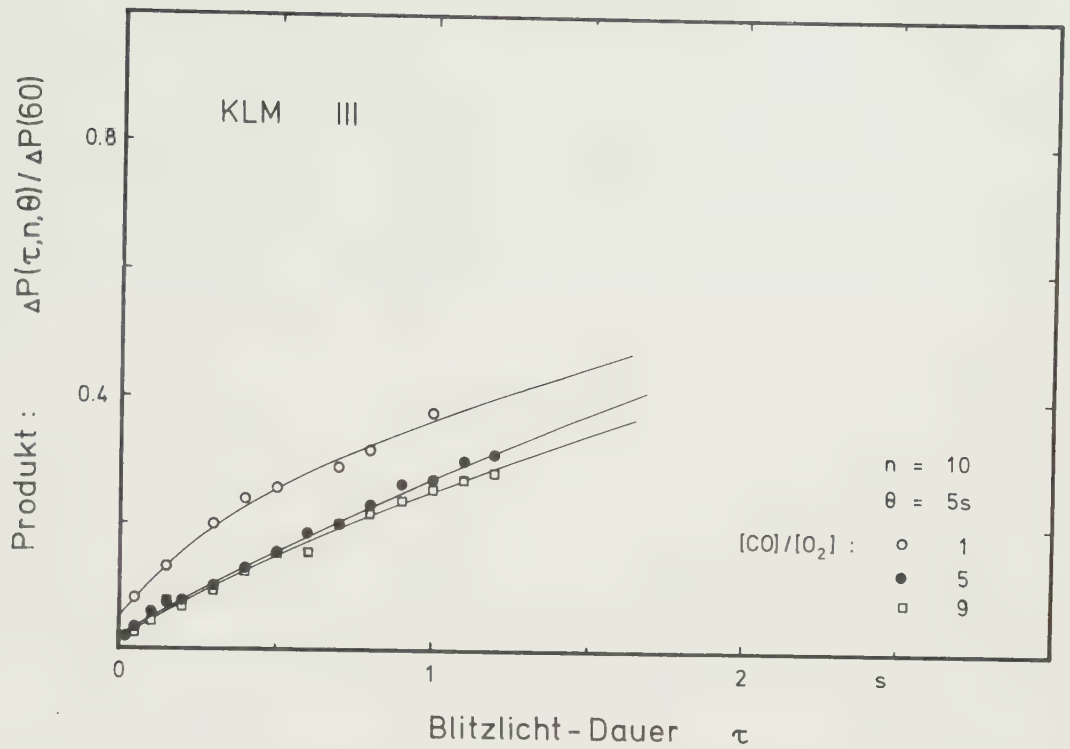


Abb. 4-4:

Produktzuwachs bei verschiedenen CO : O₂ Verhältnissen für Hellzeiten im Bereich² 0 - 3 s. Gemessen wurde $\Delta P(\tau, \nu, n)$ mit $\nu = 5$ s, $n = 10$. Die Kurven zeigen den "best fit" der Funktion $y(\tau)$, wobei der Parameter A vorgegeben wurde.

- a) (s. oben) CO : O₂ = 9 : 1 / 5 : 1, Präparation KLM I
- b) (s. S. 47) CO : O₂ = 9 : 1 / 5 : 1 / 1 : 1, Präparation KLM III
- c) (s. S. 47) CO : O₂ = 5 : 1 / 2 : 1, Präparation KLM IV



Die Dunkel-Relaxation des Enzymsystems

Nach einer Bestrahlung relaxiert das Enzymsystem wieder in seinen Dunkelzustand (siehe oben). Wird die Bestrahlung nach einer Dunkelzeit τ wiederholt, so wird man denselben Produktzuwachs $\Delta P(\tau)$ erwarten, wenn das Enzymsystem in der Zeit τ vollständig relaxiert; entsprechend erwartet man in diesem Fall nach einer n-fachen Bestrahlung einen insgesamten n-fachen Produktzuwachs

$$\Delta P(\tau, \tau, n) = n \cdot \Delta P(\tau); \quad \tau \text{ "groß"} \quad (4.7)$$

Diese Gleichung ist jedoch nicht mehr richtig, wenn die Dunkelzeit τ so klein ist, daß das Enzymsystem in dieser Zeit nicht vollständig relaxiert; in diesem Fall bleibt der Produktzuwachs ΔP eine allgemeine Funktion von τ und n (vgl. Gl. (2.1) und Gl. (2.2)).

Die Abb. 4-5 zeigt die Abhängigkeit des Produktzuwachses von der Dunkelzeit τ . Der Produktzuwachs wurde jeweils nach 10 bzw. 5 Bestrahlungen gemessen, wobei die Dunkelzeit τ zwischen den einzelnen Bestrahlungen variiert wurde: $\tau = 5$ s, $\tau = 10$ s ($n = 10$) und $\tau = 20$ s ($n = 5$). In Abb. 4-5 ist jeweils der relative Produktzuwachs dividiert durch die Anzahl der Blitze

$$\tilde{\Delta P}^r = \tilde{\Delta P}(\tau, \tau, n) / n \quad (4.8)$$

aufgetragen, um so Meßreihen mit unterschiedlichen n miteinander vergleichen zu können. Man erkennt eine geringe, jedoch signifikante Abhängigkeit des Produktzuwachses ΔP von der Dunkelzeit τ zwischen den einzelnen Blitzen. Aus einem Vergleich mit der Meßreihe $n = 1$ in Abb. 4-6 ergibt sich, daß das Enzymsystem selbst nach 20 s noch nicht vollständig relaxiert ist; eine kürzere Dunkelzeit $\tau = 10$ s und $\tau = 5$ s führt jeweils zu einem verringerten Produktzuwachs. Die Abhängigkeit des Produktzuwachses von der Dunkelzeit τ zwischen den einzelnen Blitzen hebt Gl. (4.7) auf: der Produktzuwachs

nach n Blitzen ist nicht mehr die Summe aus n identischen Beiträgen. Die Abhängigkeit des Produktzuwachses von der Anzahl der Blitze zeigt Abb. 4-6. Hier ist ebenfalls der auf $n = 1$ reduzierte relative Produktzuwachs (Gl. (4.8)) aufgetragen. Deutlich erkennt man die Abnahme des auf $n = 1$ bezogenen Produktzuwachses mit zunehmender Anzahl der Blitze, wobei die Differenz zwischen den Meßreihen mit wachsender Blitzzahl abnimmt. Neben dem Betrag des Produktzuwachses wird auch der Verlauf der Anfangskinetik beeinflusst. Die Anfangsphase erscheint um so ausgeprägter, je größer die Anzahl der Blitze ist: signifikant ist der Unterschied zwischen der Meßreihe mit $n = 1$ und $n = 5$.

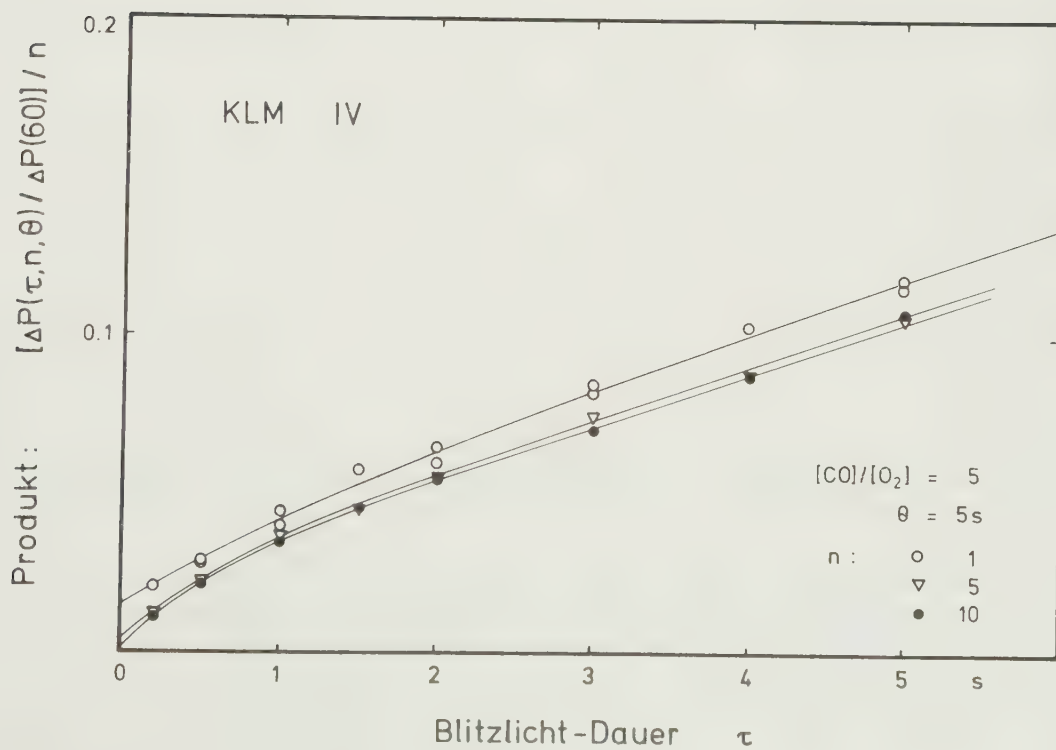
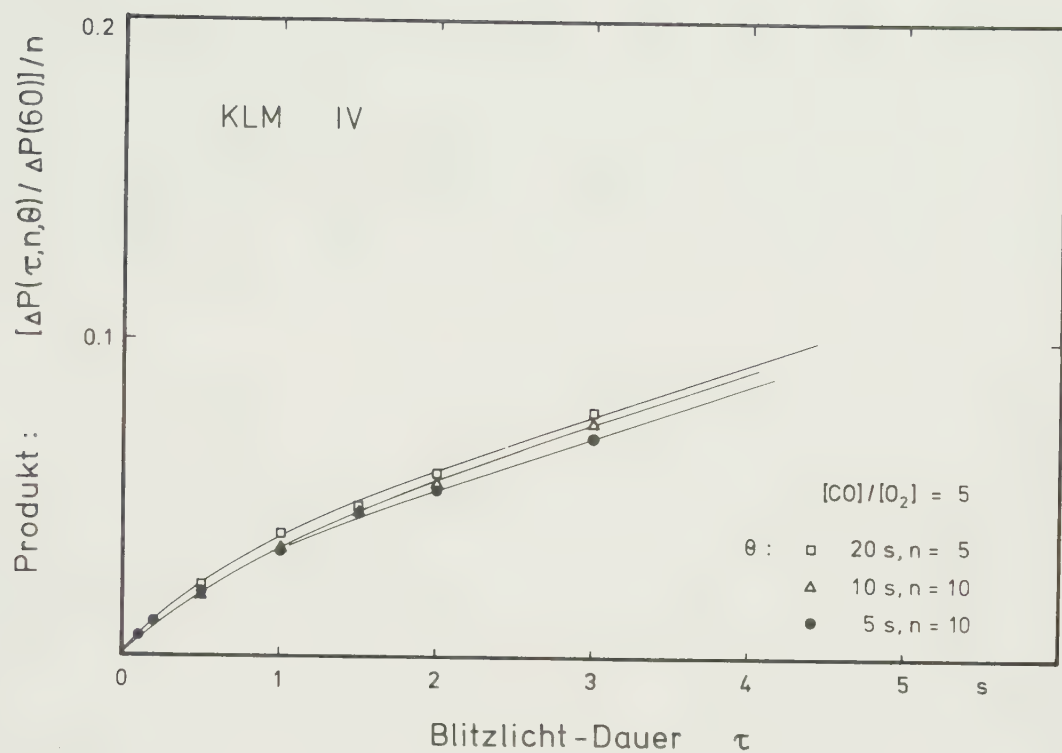
Quantitativ läßt sich die Abhängigkeit des Produktzuwachses ΔP von der Anzahl n der Blitze und der Dunkelzeit τ zwischen ihnen durch die Parameter der anpassenden Funktion $y(\tau)$ (Gl. (4.4)) beschreiben. Die Aktivität im stationären Zustand ist unabhängig von den Anfangsbedingungen zu Beginn der Bestrahlung und daher unabhängig von τ und n . In der Beschreibung durch die Funktion $y(\tau)$ drückt sich dies darin aus, daß der Parameter A , die Steigung des linearen Teils des relativen Produktzuwachses $\tilde{\Delta P}$, nicht von τ und n abhängt und daher nicht durch die Variation von τ und n beeinflusst wird. Mit dieser Randbedingung, nämlich A gleich dem Wert aus der Meßreihe mit $n = 1$ (s. Abb. 4-6 bzw. Abb. 4-2 und Tab. 4-8) wurde die Funktion $y(\tau)$ den Meßreihen (Abb. 4-5 und 4-6) angepaßt. Die Abhängigkeit des Produktzuwachses von τ und n zeigt sich in dem Parameter B als

Seite 50:

Abb. 4-5: Einfluß der Dunkelzeit auf den Produktzuwachs. Gemessen wurde $\Delta P(\tau, \tau_0, n)$ mit $n = 10(5)$ im Bereich $0 \leq \tau \leq 3$ s.

Abb. 4-6: Abhängigkeit des Produktzuwachses von der Anzahl der Blitze. Gemessen wurde $\Delta P(\tau, \tau_0, n)$ mit $\tau_0 = 5$ s im Bereich $0 \leq \tau \leq 5$ s.

Beide Abbildungen zeigen den relativen Produktzuwachs bezogen auf $n = 1$ (Gl. (4.8)). Die Messungen wurden an Mikrosomen der Präparation KLM IV durchgeführt.



pauschaler Effekt (Integration der Anfangskinetik, siehe oben). Der Einfluß von $\mathcal{N}$ und n auf die Ausprägung der Anfangsphase spiegelt sich in den Parametern y_0 und α , dem Anfangswert der Funktion $y(\tau)$ und der deskriptiven Relaxationskonstanten dieser Funktion wieder. Die Tabellen 4-10 und 4-11 zeigen die "best fit" Werte für B , y_0 und α , wobei B und y_0 auf $n = 1$ reduziert wurden:

$$B^r = B / n; \quad y_0^r = y_0 / n. \quad (4.9)$$

Die Werte für B bzw. B/n zeigen quantitativ, wie der in der Anfangsphase gebildete Produktzuwachs - bezogen auf jeweils einen Blitz - mit kürzer werdender Dunkelzeit und zunehmender Anzahl der Blitze signifikant abnimmt. Die Werte y_0 bzw. y_0/n und α lassen einen signifikanten Unterschied zwischen der Meßreihe mit $n = 1$ (Abb. 4-6) und den Meßreihen mit $n > 1$ (Abb. 4-5 und 4-6) erkennen.

		$A/10^{-2}$	$B/10^{-2}$	$y_0/10^{-2}$	α/s^{-1}	F	χ^2/ν
KLM	IV	1.61 $\pm .01$	3.5 $\pm .3$	1.5 $\pm .5$	0.7 $\pm .4$	1.020 $\pm .004$	0.24
KLM	VI	1.58 $\pm .04$	5.0 ± 2.0	2.2 $\pm .6$	0.3 $\pm .3$	1.00 $\pm .01$	0.42

Tabelle 4-8: Optimierte Parameterwerte der Funktion $y(\tau)$ für die Meßreihen der Abb. 4-2.

Die Tabelle zeigt die "best fit"-Werte und deren Standardabweichung. Angegeben sind die Parameterwerte der korrigierten Funktion $y_{\text{kor}}(\tau)$ (Gl. (4.6)); außerdem enthält die Tabelle den Wert des Korrekturfaktors F und den χ^2/ν -Wert.

Präpa- ration		$[CO]/[O_2]$	$B/10^{-2}$	$y_0/10^{-2}$	α/s^{-1}	χ^2/ν
KLM I	5		1.64 ± 0.6	$.5 \pm .8$	1.7 ± 0.2	0.20
	9		1.43 ± 0.9	$.8 \pm .4$	0.8 ± 0.1	1.58
	1		2.1 ± 2	$.5 \pm .3$	3 ± 2	0.33
KLM III	5		1.7 ± 6	$2.3 \pm .8$	1 ± 1	0.29
	9		1.0 ± 2	$1.7 \pm .5$	2 ± 1	0.68
KLM IV	2		2.6 ± 1	$4.3 \pm .2$	1.5 ± 0.4	0.45
	5		2.0 ± 1	$1.7 \pm .2$	1.9 ± 0.3	0.54

Tabelle 4-9: Optimierte Parameter der Funktion $y(\tau)$
für die Meßreihen der Abb. 4-4.

$\mathcal{N}$	n	$B^r/10^{-2}$	$y_0^r/10^{-2}$	α/s^{-1}	χ^2/ν
5	10	2.0 ± 0.1	0.2 ± 0.2	1.9 ± 0.3	0.54
10	10	2.4 ± 0.2	0.0 ± 0.6	1.2 ± 0.5	0.48
20	5	2.7 ± 0.3	0 ± 1	1.5 ± 1.0	0.55

Tabelle 4-10: Optimierte Werte der Parameter B , y_0 und α für die Meßreihen in Abb. 4-5. Es sind die auf $n = 1$ reduzierten Parameterwerte angegeben (siehe Gl. (4.9)).

n	$B^r/10^{-2}$	$y_0^r/10^{-2}$	α/s^{-1}	χ^2/ν
1	3.5 ± 0.3	1.5 ± 0.5	0.7 ± 0.4	0.24
5	2.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	1.4 ± 0.4	0.37
10	2.2 ± 0.1	0.2 ± 0.3	1.7 ± 0.4	0.25

Tabelle 4-11: Optimierte Werte der Parameter B , y_0 und α für die Meßreihen in Abb. 4-6. Die Angaben für B und y_0 beziehen sich auf die reduzierten Parameter B^r und y_0^r (siehe Gl. (4.9)).

5. Auswertung und Diskussion der Meßergebnisse

Mit den Meßreihen der Produktfunktion des Cytochrom P-450-Enzymsystems kennen wir die Anfangskinetik des Systems in einer integrierten Form wie sie allgemein in Kap. 2 (Abschn. 2.3) angegeben wurde. Es ist nun Aufgabe dieses Kapitels, eine kinetische Analyse des Enzymsystems durchzuführen und für den katalytischen Zyklus des Cytochrom P-450 ein Modell aufzustellen, auf dessen Grundlage die Meßreihen der integrierten Anfangskinetik ausgewertet werden können.

Zu Beginn fassen wir einige generelle Merkmale der integrierten Anfangskinetik, wie sie sich aus den Meßreihen ergibt, zusammen (Abschn. 5.1). Unabhängig von einer "Erklärung", d.h. einer Begründung durch bestimmte Reaktionsmechanismen, stellen die Merkmale einen Katalog von Eigenschaften dar, die ein Modell der Cytochrom P-450-Aktion reproduzieren sollte - ebenfalls ohne daß wir den Reaktionsablauf notwendig vollständig kennen.

Die Analyse des Enzymsystems beginnen wir mit dem Reaktionszyklus des Cytochrom P-450, dem terminalen Enzym des Systems. Nach der Darstellung des Reaktionszyklus (Abschn. 5.2) formulieren wir ein Modell für den Cytochrom P-450-Zyklus und leiten daraus eine Produktfunktion des Modells, die "Modellfunktion", ab (Abschn. 5.3).

Das kinetische Verhalten des Enzymsystems insgesamt - der enzymatische Ansatz - zeigt unter den speziellen experimentellen Bedingungen zwei kinetische Komponenten, die wir auf zwei "kinetische Systeme" zurückführen (Abschn. 5.4). Der Beitrag des zweiten Systems neben dem Cytochrom P-450-Zyklus zur Produktfunktion führt auf eine Erweiterung der obigen Modellfunktion; die erweiterte Modellfunktion kann die wesentlichen Merkmale der Meßreihen reproduzieren.

Im letzten Abschnitt des Kapitels (Abschn. 5.5) werten wir zwei Meßreihen mit der erweiterten Modellfunktion aus. Über eine Anpassung der Modellfunktion an die Produktfunktion der Meßreihen bestimmen sich die Werte der Modellparameter; aus der quantitativen Bestimmung des Modells erhalten wir numerische Angaben über weitere Parameter der Katalyse wie der prozentuale Anteil der aktiven Enzymmoleküle und die Wechselzahl des Cytochrom P-450-Zyklus.

5.1 Merkmale der Produktfunktion $\Delta P(\tilde{\Delta}P)$

Die Meßreihen der Produktfunktion $\tilde{\Delta}P(\tau)$ bzw. $\tilde{\Delta}P(\tau, \vartheta, n)$ sind durch einige charakteristische Merkmale gekennzeichnet:

Merkmale, die auf jede einzelne Meßreihe zutreffen

- der Verlauf der Produktfunktion
- der extrapolierte Anfangswert y_0

und Merkmale, die für eine Meßreihenserie (die Variation eines Parameters) gelten

- die Abhängigkeit des Parameters B von ϑ und n
- der Verlauf der relativen Produktfunktion bei verschiedenen CO : O₂ Verhältnissen im enzymatischen Ansatz.

Das Hauptmerkmal aller Meßreihen stellt der Verlauf der Produktfunktion $\Delta P(\tilde{\Delta}P)$ dar, der bereits durch die deskriptive Funktion $y(\tau)$ (Gl. (4.4)) hinreichend charakterisiert ist: Die integrierte Form der Anfangskinetik, die die Produktfunktion darstellt, zeigt einen stetig mit der Belichtungszeit τ wachsenden Verlauf mit stetig - bis zum stationären Endwert - abnehmender Steigung; ein Wendepunkt oder gar ein Plateau ist in keinem Fall zu erkennen. In früheren Untersuchungen hatten wir einen Verlauf der Anfangskinetik gefunden, der ein Plateau im Bereich $1 \text{ s} < \tau < 3 \text{ s}$ vermuten ließ (32). Allerdings wiesen die damaligen Messungen eine

höhere Streuung auf - die Meßwerte schließen eine Darstellung gemäß der Funktion $y(\tau)$ (Gl. (4.4)) nicht aus. Diese Strukturlosigkeit der Anfangskinetik erschwert natürlich deren Auswertung und eine mögliche Differenzierung unterschiedlicher Modellansätze.

Ein zweites generelles Merkmal zeigt sich in der Extrapolation der Produktfunktion gemäß der Funktion $y(\tau)$ auf

$\tau = 0$ s; signifikant für Meßreihen mit einmaliger Bestrahlung ($n = 1$) aber auch deutlich in den anderen Meßreihen liegt der Anfangswert der Funktion $y(\tau)$ nicht bei Null:

$$y(0) = y_0 > 0 .$$

Bereits sehr kleine Belichtungszeiten (0.1 s) ergeben einen "sprunghaften" Produktzuwachs etwa von der Größe y_0 , der auf eine schnelle Komponente in der Anfangskinetik hinweist; die Größe nimmt offenbar mit mehrfacher Bestrahlung ($n > 1$) ab und verhält sich damit analog zu der Größe B (siehe unten).

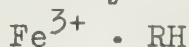
Die beiden übrigen Merkmale, die wir aufführen, betreffen den Einfluß experimenteller Parameter auf die Produktfunktion. Das eine Merkmal kennzeichnet die Änderung der Produktfunktion bei mehrfacher Bestrahlung der Proben, die Abhängigkeit des Parameters B von der Anzahl der Bestrahlungen und der Dunkelzeit zwischen ihnen. Das Verhalten der Produktfunktion in Abhängigkeit von τ und n haben wir in Kap. 4 ausführlich beschrieben. Ebenso ist das andere Merkmal, der charakteristische Einfluß des $\text{CO} : \text{O}_2$ Verhältnisses auf den Verlauf der relativen Produktfunktion, ΔP , in Kap. 4 ausführlich dargestellt.

5.2 Der Katalysezyklus des Cytochrom P-450

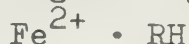
Das Modell des Reaktionszyklus des Cytochroms P-450 beruht auf der experimentell gesicherten prinzipiellen Struktur des Reaktionszyklus, die heute allgemein akzeptiert wird (1/ 2/ 3).

Die Monooxygenierung eines Substrates durch das Cytochrom P-450 umfaßt im wesentlichen die fünf folgenden Schritte (Abb. 5-1)

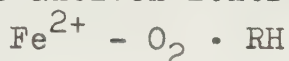
- die Bildung des Cytochrom P-450-Substrat-Komplexes:



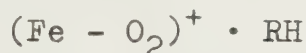
- die Reduzierung des Cytochrom P-450-Substrat-Komplexes:



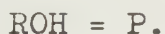
- die Anlagerung von Sauerstoff (O_2) an das zweiwertige Hämeisen des aktiven Zentrums:



- die Überführung eines weiteren Elektrons auf den oxygenierten Komplex:



- die Aktivierung des Sauerstoffs, die zur Monooxygenierung des Substrats führt:



Das Produkt wird aus dem aktiven Zentrum des Cytochroms P-450 entlassen, ebenso ein Hydroxyl-Ion, das Cytochrom befindet sich wieder in dem Ausgangszustand Fe^{3+} .

Der Cytochrom P-450-Substrat-Komplex

Die Monooxygenierung des Substrats wird mit der Bildung des Cytochrom P-450-Substrat-Komplexes eingeleitet. Die Bildung des Cytochrom P-450-Substrat-Komplexes beruht auf der Wechselwirkung des Substrats mit der "binding site" des aktiven Zentrums des Cytochroms. Die Kinetik der Komplexbildung wird als Funktion dieser Wechselwirkung sowohl mit den Substraten wie auch mit den jeweiligen Cytochrom P-450-Spezies variieren. In allen Fällen scheint die Substratanlagerung die katalytische Aktivität jedoch nicht zu limitieren. Die Substratanlagerung an das Cytochrom P-450 geschieht "schnell": der Cytochrom-Substrat-Komplex wird bei Substratüberschuß mit einer Rate in der Größenordnung von $10^2 - 10^3 \text{ s}^{-1}$ gebildet (4 / 5/6);

verschiedene Cytochrom P-450-Spezies können die Assoziationskonstante der Anlagerung um eine Größenordnung beeinflussen (7).

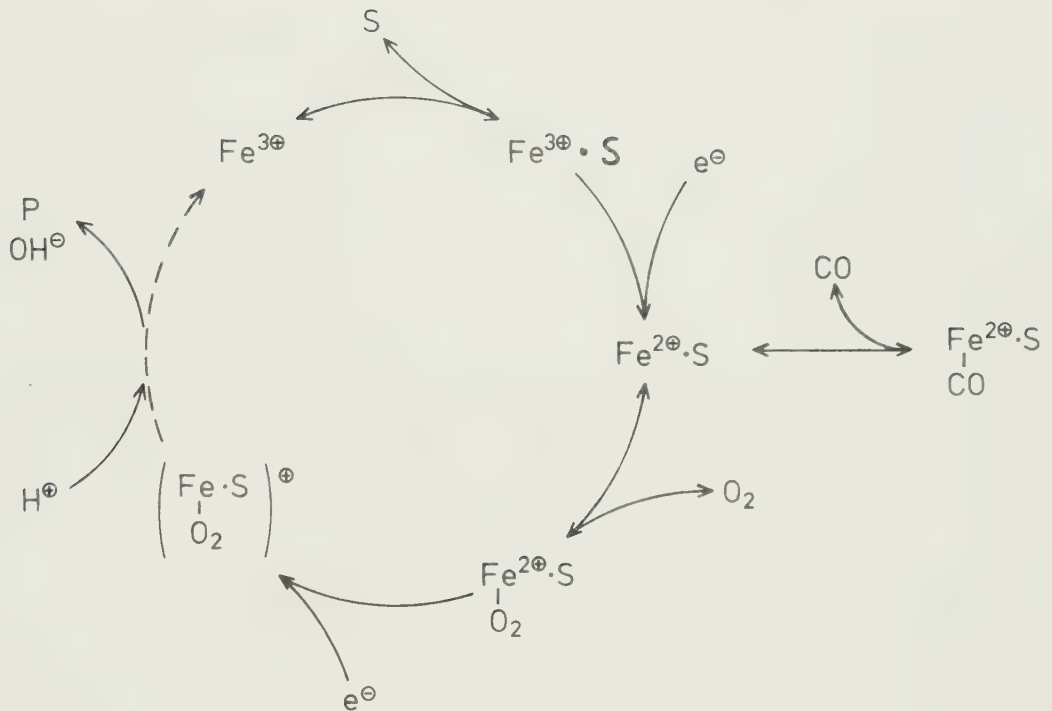


Abb. 5-1: Schema des Cytochrom P-450-Reaktionszyklus

Der Zyklus basiert auf der Brutto-Gleichung (33)

$$\text{RH}(\text{S}) + \text{DoH}_2 + \text{O}_2 \longrightarrow \text{ROH}(\text{P}) + \text{Do} + \text{H}_2\text{O}$$

S bezeichnet das Substrat, den Reaktanten mit der ausgezeichneten H-Bindung, RH, P das Produkt, den hydroxilierten Reaktanten, ROH. Der Wasserstoffdonor DoH_2 liefert die Reduktionsäquivalente e^- .

Die Reduktion des Cytochroms

Mit der Reduktion des Enzym-Substrat-Komplexes wird das Hämeisen aus dem 3-wertigen (ferri-) in den 2-wertigen (ferro-) Zustand überführt. Dieser Reaktionsschritt läßt sich indirekt über den Kohlenmonoxidkomplex nachweisen, den das Ferro-Eisen in Gegenwart von Kohlenmonoxid bildet. Die Reduktion des Cytochrom P-450 ist ausgiebig untersucht worden (8 / 9 / 10 / 11). Unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Kohlenmonoxid finden alle Autoren einen zweiphasigen Verlauf der Reduktion, der auf zwei kinetische Komponenten zurückgeführt wird: eine schnelle Komponente mit einer Zeitkonstanten von der Größenordnung 1 s und eine langsame Komponente, deren Zeitkonstante etwa 10mal größer ist als die der schnellen Komponente. Die Reduktionsrate wird in Gegenwart von Substrat erheblich erhöht; der Einfluß von Substrat auf die beiden kinetischen Komponenten ist nicht eindeutig, eine Aussage hängt hier vom zu Grunde liegenden Reaktionsmodell der Reduktion ab (12). Befunde, daß katalytische Aktivität mit der Zeitkonstanten der schnellen Reduktionskomponenten korreliert (9) und daß Reduktionsrate und Aktivität in derselben Größenordnung liegen (13), haben zu der Hypothese geführt, daß der erste Reduktionsschritt für den gesamten Zyklus geschwindigkeitslimitierend wirkt. Allerdings weisen neuere Untersuchungen auf mindestens noch einen weiteren limitierenden Schritt hin (6/10/14/15) (siehe unten). Das Cytochrom P-450 wird von der NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase reduziert, einem Flavoprotein mit zwei Flavinen (16). Unter anaeroben Bedingungen - wie sie bei den Messungen zur Reduktionskinetik herrschten - ist das Cytochrom P-450 ein Ein-Elektronen-Akzeptor (17 / 18): pro Kohlenmonoxid-Komplex, den das Cytochrom bildet, wird ein Elektron benötigt.

Für die Versuche zur Reduktion von Cytochrom P-450 gilt die grundsätzliche Einschränkung, daß sie unter den unphysiologischen Bedingungen der Anaerobizität und einer hohen Kohlenmonoxidkonzentration durchgeführt wurden. Da der Kohlenmonoxidkomplex im Gegensatz zum Sauerstoffkomplex des Cytochroms

kein weiteres Elektron aufnehmen kann, ist ein unterschiedlicher Reaktionsmechanismus für die Elektronenübertragung in den beiden Fällen durchaus denkbar. In welcher Weise die unphysiologischen Versuchsbedingungen die Reduktionskinetik beeinflussen, können wir dann entscheiden, wenn wir den Mechanismus der Reduktion im Detail kennen. Wir diskutieren diesen Punkt ausführlich in Abschnitt 5.4.

Die Kohlenmonoxid-Inhibierung

Das reduzierte Cytochrom bindet molekularen Sauerstoff und bildet einen $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2\text{-(Substrat)-Komplex}$. In Gegenwart von Kohlenmonoxid erfolgt die Anlagerung von O_2 kompetitiv zu CO (19); die Bildung des inaktiven $\text{Fe}^{2+}\text{-CO-Komplexes}$ unterbricht den katalytischen Zyklus an dieser Stelle. Die Affinität des Kohlenmonoxids ist vergleichbar der des Sauerstoffs, so daß die katalytische Aktivität in Gegenwart von Kohlenmonoxid und Sauerstoff nur zu einem Teil gehemmt ist. Das Verhältnis der beiden Gase, das eine 50%-ige Hemmung hervorruft, variiert von $[\text{CO}]/[\text{O}_2] > 1$ bis zu ≈ 0.2 (20). Im Einklang damit steht eine Untersuchung der Kinetik der $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ und $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ Komplexbildung; die Assoziationskonstante des Sauerstoffs gleicht der des Kohlenmonoxids ($K_{\text{ass}} \approx 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ l}$) (21), womit sich bei gleichen Partialdrücken von Sauerstoff und Kohlenmonoxid mit dem kompetitiven Verhalten der Gase eine ca. 50%-ige Hemmung ergibt.

Der Kohlenmonoxid-Komplex läßt sich leicht photodissoziieren; die Photodissoziation überlagert sich der spontanen Dissoziation, sie wird durch eine Geschwindigkeitskonstante k^* beschrieben; die effektive Dissoziationsrate ist gleich der Summe der spontanen und der photoinduzierten Rate (22).

Der Cytochrom-Sauerstoff-Komplex ("spektraler Zwischenzustand")

Die Bildung des Cytochrom P-450-Substrat-Sauerstoff-Komplexes ist nach der Reduktion der nächste wesentliche Schritt zur Vorbereitung der eigentlichen Monooxygenierung des Substrats^{*)}. Unter steady state Bedingungen zeigt das aktive Enzymsystem im Differenzspektrum gegen das oxidierte (NADPH-freie) System sauerstoffabhängige Spektralbanden bei ungefähr 440 nm und 590 nm (25 / 26).

Flash photolysis-Experimente an Mikrosomen in Gegenwart von Kohlenmonoxid und Sauerstoff ergeben eine sauerstoffbedingte Absorptionsbande mit einem Maximum bei 445 nm (21). Diese Befunde einer spektral nachweisbaren Reaktionsstufe am Cytochrom P-450 werden einer oxygenierten Form des Cytochrom P-450-Substrat-Komplexes zugeschrieben: mit der Anlagerung des Sauerstoffs an das formal zweiwertige Eisen, Fe^{2+} , bildet sich ein oxy-ferro-Komplex, wie er für das bakterielle Cytochrom P-450_{cam} nachgewiesen wurde (27).

Das Auftreten des "spektralen Zwischenzustandes" (25) deutet auf einen langsamen Schritt im Anschluß an die Oxygenierung des Cytochrom P-450-Substrat-Komplexes hin. Kinetische Untersuchungen zur Entstehung des "spektralen Zwischenzustandes" lassen zwei Formen des oxygenierten Komplexes erkennen (26 / 28): die erstere bildet sich mit hoher Geschwindigkeit und geht dann sukzessive in eine zweite, stabilere Form über; das Spektrum der letzteren Form gleicht dem des "spektralen Zwischenzustandes". Ohne Zuführung eines weiteren Elektrons auf den oxygenierten Komplex zerfällt die "zweite Form" des oxy-Komplexes, wobei das Cytochrom in seinem dreiwertigen Ausgangszustand Fe^{3+} zurückbleibt (26 / 29).

^{*)} Reduktion und molekularer Sauerstoff sind nicht unbedingte Voraussetzung für eine Monooxygenierung von Substanzen; organische Hydroperoxide können - in vitro - ebenfalls als Sauerstoffdonoren fungieren, wobei Cytochrom P-450 den Transfer des Sauerstoffatoms katalysiert (23 / 24).

Die Aktivierung des Oxy-Komplexes

Der molekulare Sauerstoff kann die Substrate nur über eine aktive Form angreifen (1); die Aktivierung des Oxy-Komplexes erfordert die Zuführung eines weiteren Elektrons: dieses Elektron wird wahrscheinlich wie das vorhergehende durch die NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase auf das Cytochrom übertragen. Die aktive Form des Cytochrom P-450-Sauerstoff-Komplexes besteht wahrscheinlich in einem $(\text{Fe-O})^{3+}$ Zustand. Werden im enzymatischen Ansatz Sauerstoff und Elektronendonoren durch Hydroperoxide ersetzt (s. Anmerkung vorherige Seite), so findet man im Differenzspektrum eine Hydroperoxid-bedingte Bande bei 440 nm, deren Intensität mit der enzymatischen Aktivität korreliert (30). Die Absorptionsbande wird dem aktiven $(\text{Fe-O})^{3+}$ Zustand zugeordnet; die Absorptionsbande gleicht dem "spektralen Zwischenzustand" (siehe oben), der damit auch als der aktive Cytochrom P-450-Sauerstoff-Komplex interpretiert werden kann. Die unterschiedlichen Interpretationen des "spektralen Zwischenzustandes" betreffen jeweils auch den geschwindigkeitslimitierenden Schritt, der dem Zwischenzustand folgt: wird das Spektrum dem Oxy-Komplex zugeordnet, liegt der limitierende Schritt möglicherweise in der Zuführung des zweiten Elektrons; wird das Spektrum mit dem aktiven Sauerstoff-Komplex identifiziert, kann die Elektronenübertragung kein limitierender Schritt sein; in diesem Fall liegt die Limitierung in dem Prozeß der Aktivierung und des darauf folgenden Angriffs auf das Substrat.

5.3 Der Modellzyklus für Cytochrom P-450

Das kinetische Verhalten des Reaktionszyklus des Cytochrom P-450 insgesamt - seine mittlere Zeitdauer für einen 'turn-over' - wie auch das einzelner Reaktionsstufen - die Konzentration eines Zwischenzustandes - wird prinzipiell durch alle am Zyklus beteiligten Reaktionen bestimmt. Unter speziellen Bedingungen - wie der, daß einige Reaktanten als (quasi-)konstant betrachtet werden können und der, daß die

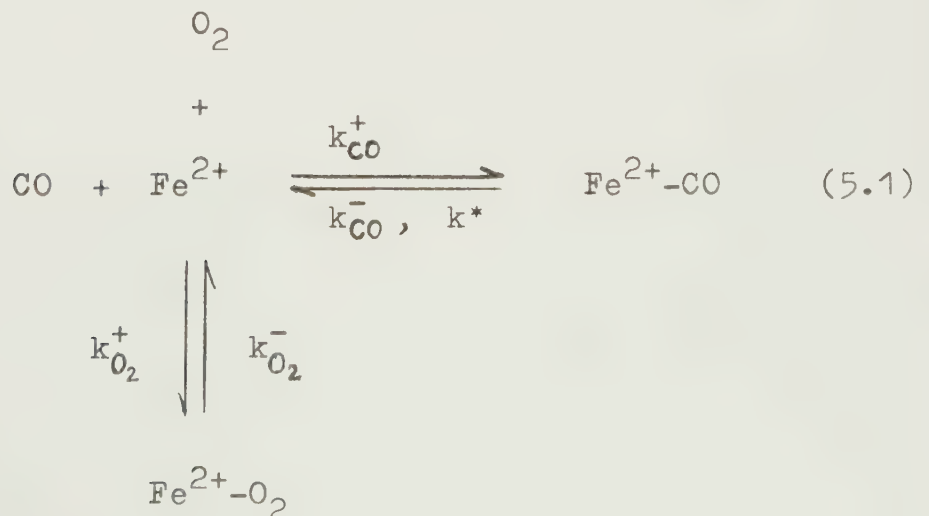
Geschwindigkeitskonstanten einiger Reaktionen groß gegenüber denen anderer Reaktionen sind - kann die kinetische Beschreibung des Katalysezyklus erheblich vereinfacht werden.

Die kinetische Reduktion des katalytischen Zyklus

Für die quantitative Beschreibung des Reaktionszyklus' des Cytochrom P-450 reduzieren wir den Zyklus auf seine wesentlichen Reaktionsstufen; wir erhalten einen Modellzyklus, dessen kinetisches Verhalten den Reaktionszyklus innerhalb bestimmter - durch die Reduktion gegebener - Grenzen nachbildet. Der Modellzyklus benutzt vier Reaktionsstufen (Abb. 5-2)

- den reduzierten Cytochrom-Substrat-Komplex $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{S}$
- den oxygenierten Komplex $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2 \cdot \text{S}$
- den oxidierten Zustand des Cytochroms Fe^{3+}
- und zur Beschreibung der experimentellen Bedingungen den Cytochrom-Substrat-Kohlenmonoxid-Komplex ($\text{Fe}^{2+}\text{-CO} \cdot \text{S}$).

Die Anlagerung von Kohlenmonoxid und Sauerstoff an das reduzierte Cytochrom P-450 erfolgt gemäß dem Reaktionsschema



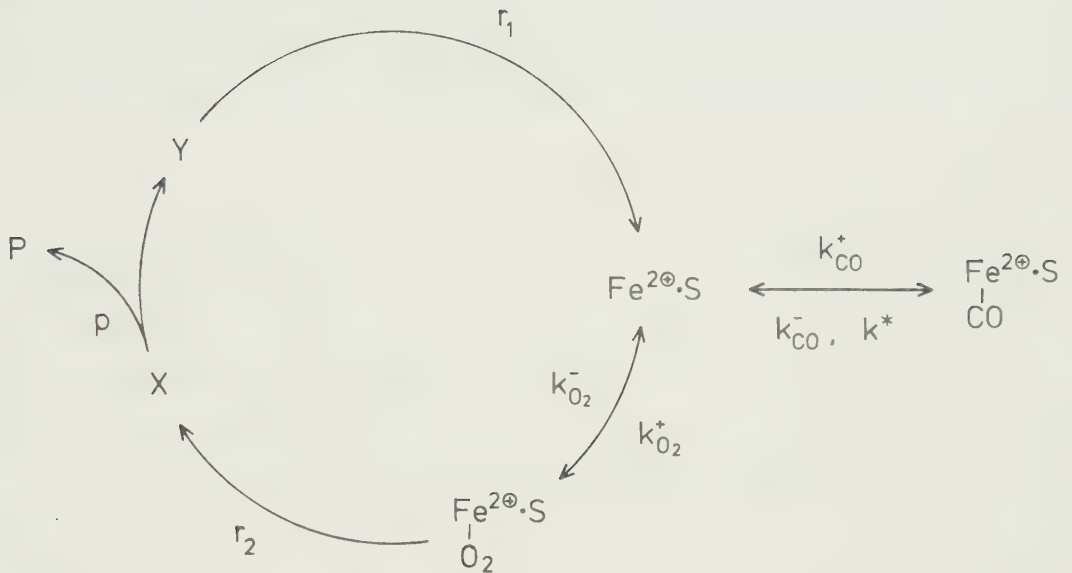


Abb. 5-2:

Der Modellzyklus für Cytochrom P-450

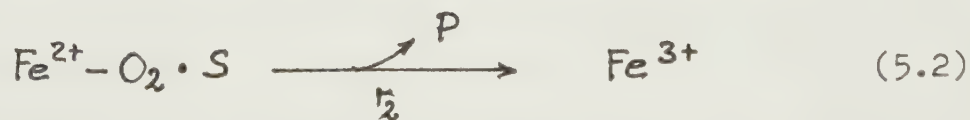
In der Beschreibung des Modells wird die Zwischenstufe X, die hypothetische Vorstufe der Produktfreisetzung, nicht berücksichtigt: der oxygenierte Komplex "zerfällt" gemäß der Konstanten r_2 in das Produkt und das freie Enzym Fe^{3+} , das mit der Stufe Y identifiziert wird. Einzelheiten zu den Modell-Reaktionen siehe im Text.

Hierbei bedeuten $k_{O_2}^+$ und k_{CO}^+ die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung der jeweiligen Assoziationsreaktion, $k_{O_2}^-$ und k_{CO}^- die Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung der Dissoziation; k^* bezeichnet die Photodissoziationskonstante des CO-Komplexes. Die Sauerstoff- und die Kohlenmonoxid-Konzentration liegen um einen Faktor 1.000 und mehr über der Konzentration des Cytochrom P-450 und können in dem obigen Reaktionsschema als konstant betrachtet werden (siehe Gl. (5.5a)).

Der oxygenierte Komplex ($Fe^{2+}-O_2 \cdot S$) wird durch einen zweiten Reduktionsschritt in eine aktive Form überführt. Der aktive Zustand "zerfällt" seinerseits in das Produkt der Katalyse und einen Zustand Y, den wir als den Ausgangszustand des Cytochrom P-450 (Fe^{3+}) identifizieren können^{*)}; der Zerfallsprozeß des aktiven Zustandes wird in der Abb. 5-2 durch



symbolisiert, womit wir die Darstellung der Produktbildung in Kapitel 2 (Abschn. 2.3) wieder aufgenommen haben. Für den Modellzyklus stellen wir den Übergang von der Stufe des Oxygenierten Cytochrom P-450-Substrat-Komplexes zum oxidierten Cytochrom P-450 durch die eine pauschale Konstante r_2 dar:



Dieser Schritt - im Modell - umfaßt also die Übertragung des zweiten Elektrons auf den Cytochrom P-450-Substrat-Sauerstoff-Komplex, die Aktivierung des Komplexes und seinen Zerfall in das Produkt und den Ausgangszustand des Cytochroms. In der Geschwindigkeitskonstanten r_2 sind also die möglichen geschwindigkeitslimitierenden Schritte, die auf die Sauerstoffanlagerung folgen, in einer Konstanten zusammengefaßt;

^{*)} Dies entspricht der Annahme, daß die Abspaltung des Produkts den letzten Schritt im Zyklus darstellt.

wir verzichten somit auf eine Identifizierung möglicher Zwischenstufen, die bei dem derzeitigen Stand der Kenntnisse über diesen Zyklusabschnitt ohnehin nur sehr spekulativ ausfallen kann.

Mit der Bildung eines Cytochrom P-450-Substrat-Komplexes beginnt der Zyklus wieder von neuem. Der Schritt



umfaßt die Anlagerung des Substrats an das oxidierte Cytochrom (Fe^{3+}) und die Reduktion des Cytochrom-Substrat-Komplexes. Die hohe Substratkonzentration im enzymatischen Ansatz - das fünfzehnfache der halbmaximalen Sättigungskonzentration - macht die Katalyserate unabhängig von der absoluten Größe der Substratkonzentration; die Bildungsgeschwindigkeit der Cytochrom-Substrat-Komplexe ist also groß gegenüber den limitierenden Reaktionen des Zyklus. Der Übergang von der oxidierten Stufe zum reduzierten Substrat-Komplex des Cytochroms wird - wenn er sich nicht als "sehr schnell" erweist - allein durch die Reduktion des Substrat-Komplexes limitiert. Mit der hohen Überschußkonzentration des Elektronendonors NADPH - drei Größenordnungen über der halbmaximalen Sättigungskonzentration - wird die Reduktionsrate des Cytochroms P-450 unabhängig von der Reduktionskinetik des Elektronen-Überträgers, der Cytochrom P-450-Reduktase. Die Reduzierung des Cytochrom-Substrat-Komplexes wird hier durch die eine Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung r_1 beschrieben; diese Annahme eines pseudomonomolekularen Reaktionsmechanismus wird durch die Untersuchungen zur Reduktionskinetik gestützt, aus denen sich ein exponentieller Verlauf der schnellen Phase der Reduktion unter anaeroben Bedingungen ergibt (s. Abschn. 5.2).

Der Modellzyklus reduziert den Reaktionszyklus des Cytochrom P-450 auf drei Schritte, die erste Reduktion (r_1), die Anlagerung des Sauerstoffs und den Schritt von der Stufe des

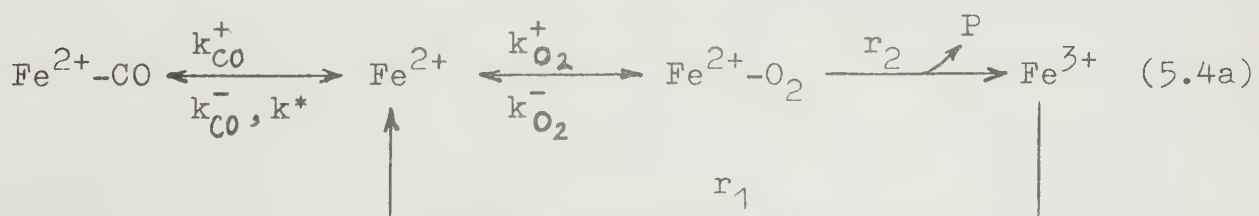
Sauerstoff-Komplexes zur Stufe der Produktablösung (r_2); das Modell berücksichtigt außerdem den Kohlenmonoxid-Komplex des Cytochroms, dessen Dissoziation den ersten Schritt in der Anfangskinetik des Systems darstellt. Assoziation und Dissoziation von Sauerstoff und Kohlenmonoxid werden durch das Modell mit der Annahme von Elementarreaktionen gut beschrieben. Dagegen sind die Reaktionsmechanismen, die den Geschwindigkeitskonstanten r_1 und r_2 zu Grunde liegen, nicht bekannt; die Konstanten repräsentieren zwei "langsame", d.h. die Katalyserate limitierende Schritte im Reaktionszyklus des Cytochroms. Der Modellzyklus beruht also auf zwei Näherungen: einmal wird der Reaktionszyklus auf die geschwindigkeitslimitierenden Schritte reduziert, die "schnellen" Reaktionen werden mit den "langsamen" zusammengefaßt, und zum zweiten werden die "langsamen" Reaktionen als (pseudo-)monomolekulare Reaktionen behandelt. Der Modellzyklus stellt ein kinetisches Analogon zum Reaktionszyklus des Cytochroms dar und erlaubt daher keine Schlüsse auf Reaktionsmechanismen einzelner Katalyseschritte.

Die quantitative Formulierung des Modellzyklus :
das Differentialgleichungssystem des Modells

Der Modellzyklus führt auf ein System von Differentialgleichungen, die sich jeweils für die einzelnen Zyklusstufen ergeben. Die Lösung dieses Differentialgleichungssystems stellt die quantitative Formulierung der Kinetik des Modellzyklus dar.

Bevor wir die Differentialgleichungen aufstellen, diskutieren wir einige allgemeine Eigenschaften des Zyklus und führen eine formalisierte Schreibweise für die Reaktionsstufen ein.

Der Modellzyklus besteht aus der Reaktionsfolge



Die Geschwindigkeitskonstanten sind mit den Schemata (5.1) bis (5.3) definiert worden. Die Reaktanten CO und O₂ aus Schema (5.1) sind in der Darstellung (5.4a) der Übersichtlichkeit halber weggelassen, ebenso das Symbol S für das Substrat.

Wir führen für die Assoziationsreaktionen von Sauerstoff und Kohlenmonoxid die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung ein

$$k_{O_2}^+ [O_2] = k_{23}; \quad k_{CO}^+ [CO] = k_{21} \quad (5.5a)$$

und in Analogie dazu

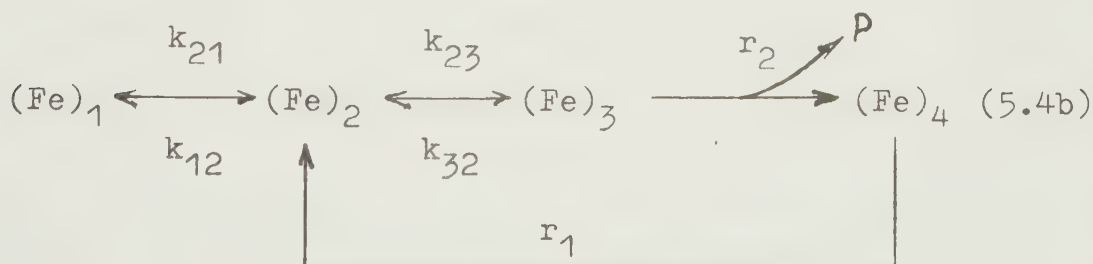
$$k_{O_2}^- = k_{32}; \quad k_{CO}^- + k^* = k_{12} \quad (5.5b)$$

wobei k_{12} die effektive Dissoziation des Kohlenmonoxidkomplexes - die spontane und die photoinduzierte - beschreibt (siehe oben).

In der Darstellung (5.4a) lassen sich die Reaktionsstufen von links nach rechts durchnummerieren. Setzen wir

Fe²⁺-CO : (Fe)₁, Fe²⁺ : (Fe)₂ usw.,

so erhalten wir die schematisierte Darstellung



Wir setzen voraus, daß alle an der Katalyse beteiligten Cytochrom-Moleküle in einer der vier Stufen (Fe)₁ bis (Fe)₄ auftreten; damit erhalten wir die Gleichung der Enzymerhaltung

$$\sum_{i=1}^4 (Fe)_i = (Fe)_{tot} \quad (5.6a)$$

in der $(\text{Fe})_{\text{tot}}$ die Menge aller aktiven Cytochrom-Moleküle bedeutet^{*)}.

Aus dem System (5.4) ergibt sich die Produktrate

$$\frac{d}{dt} P = r_2 (\text{Fe})_3 \quad (5.7)$$

und daraus die Menge des in der Zeit von t_0 bis t_1 gebildeten Produkts

$$P(t_0 \rightarrow t_1) = r_2 \cdot \int_{t_0}^{t_1} (\text{Fe})_3(t) dt \quad (5.8)$$

In Kapitel 2 haben wir einen allgemeinen Ausdruck für die Produktbildung bei "flash photolysis" angegeben. Im Modellzyklus werden die Integrale dort (Gl. (2.3)) durch die entsprechenden der Gleichung (5.8) ersetzt.

Die eingesetzte Menge an Enzym ist im Fall des Cytochrom P-450 nicht gleich der Menge der aktiven Enzymmoleküle $(\text{Fe})_{\text{tot}}$; wir normieren das System (5.4) auf die unbekannte Größe $(\text{Fe})_{\text{tot}}$ und erhalten die relativen Größen

$$x_i = (\text{Fe})_i / (\text{Fe})_{\text{tot}}, i = 1, \dots, 4 \quad (5.9)$$

Für die Enzymerhaltung folgt damit aus Gl. (5.6a)

$$\sum x_i = 1 \quad (5.6b)$$

Mit diesen Vorbereitungen können wir die Differentialgleichungen für die vier Reaktionsstufen x_i aufstellen:

^{*)} Reaktionsstufe und Konzentration bzw. Menge der Moleküle in einem Reaktionszustand werden durch dasselbe Symbol bezeichnet; die Bedeutung ergibt sich jeweils eindeutig aus dem Zusammenhang.

$$\begin{aligned}
 \dot{x}_1 &= -k_{12}x_1 + k_{21}x_2 \\
 \dot{x}_2 &= k_{12}x_1 - (k_{21} + k_{23})x_2 + k_{32}x_3 + r_1 x_4 \\
 \dot{x}_3 &= k_{23}x_2 - (k_{32} + r_2)x_3 \\
 \dot{x}_4 &= r_2 x_3 - r_1 x_4
 \end{aligned} \tag{5.10}$$

Die Differentialgleichungen des Systems (5.10) sind linear abhängig:

$$\dot{x}_1 + \dot{x}_2 + \dot{x}_3 + \dot{x}_4 \equiv 0;$$

diese Eigenschaft des Systems (5.10) ist nichts anderes als der differentielle Ausdruck für die Enzymerhaltung. Wir benutzen Gl. (5.6b) und eliminieren im Gleichungssystem (5.10) die Größe x_1 :

$$\begin{aligned}
 \dot{x}_2 &= -(k_{21} + k_{12} + k_{23})x_2 + (k_{32} - k_{12})x_3 + (r_1 - k_{12})x_4 + k_{12} \\
 \dot{x}_3 &= k_{23}x_2 - (k_{32} + r_2)x_3 \\
 \dot{x}_4 &= r_2 x_3 - r_1 x_4
 \end{aligned} \tag{5.11}$$

Das Gleichungssystem (5.11) stellt ein inhomogenes lineares Differentialgleichungssystem mit konstanten Koeffizienten von erster Ordnung dar. Die allgemeine Lösung dieses Systems besteht in einer Summe von drei Exponentialfunktionen plus einer speziellen Lösung des - inhomogenen - Systems (31).

Mit der Angabe der Lösung des Systems (5.11) ist die Aufgabe der quantitativen Formulierung des Modellzyklus prinzipiell gelöst. Allerdings läßt sich das System (5.11) um eine Gleichung reduzieren, wenn wir die Größenordnungsunterschiede zwischen den Konstanten k_{23} und k_{21} einerseits und den übrigen Konstanten andererseits berücksichtigen. Wir reduzieren damit nicht nur den Aufwand für Lösung des Differentialgleichungssystems, sondern finden auch eine quantitative Formulierung für eine charakteristische Eigenschaft des Katalysezyklus.

Wegen der großen Geschwindigkeit, mit der Sauerstoff- und Kohlenmonoxid-Komplex gebildet werden, befindet sich der Fe^{2+} -Zustand im wesentlichen^{*)} im Gleichgewicht mit dem $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ und $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ -Komplexen; bezüglich dieser Komplexe verschwindet die zeitliche Änderung des Fe^{2+} -Zustandes^{**)}

$$\frac{d}{dt} (\text{Fe})_2 \propto \dot{x}_2 \simeq 0 \quad (5.12)$$

Mit der Näherung der Gleichung (5.12) eliminieren wir x_2 aus dem System (5.11) und erhalten das neue Differentialgleichungssystem

$$\begin{aligned} \dot{x}_3 &= a x_3 + b x_4 + c \\ \dot{x}_4 &= r_2 x_3 - r_1 x_4 \end{aligned} \quad (5.13)$$

mit den Koeffizienten

$$\begin{aligned} a &= - [(k_{21} + k_{12})k_{32} + k_{23} k_{12}] / k - r_2 \\ b &= (r_1 - k_{12})k_{23}/k \\ c &= k_{12} k_{23}/k ; \quad k = k_{21} + k_{12} + k_{23} \end{aligned} \quad (5.14a)$$

Die Ausdrücke für die Koeffizienten (5.14a) lassen sich vereinfachen, indem wir den Parameter des Verhältnisses von Kohlenmonoxid- zu Sauerstoffassoziation einführen

$$\frac{k_{\text{CO}}^+ [\text{CO}]}{k_{\text{O}_2}^+ [\text{O}_2]} = \frac{k_{21}}{k_{23}} = v \quad (5.15)$$

Mit dem Parameter v ergibt sich für die Koeffizienten a bis c :

$$\begin{aligned} a &= - (v' k_{32} + k_{12}) / (v' + 1) - r_2 \\ b &= (r_1 - k_{12}) / (v' + 1) \\ c &= k_{12} / (v' + 1) \end{aligned} \quad (5.14b)$$

*) **) siehe folgende Seite

mit

$$v' = \frac{k_{21} + k_{12}}{k_{23}} = v(1 + \frac{k_{12}}{k_{21}}) \quad (5.16)$$

In den Gleichungen (5.14b) zeigt sich, daß die Kohlenmonoxid- und Sauerstoff-Konzentration im enzymatischen Ansatz nur in der Form (5.16) in das Differentialgleichungssystem (5.13) eingeht. In den Fällen, in denen k_{12} klein gegenüber k_{21} ist und demnach $v' \approx v$, wird die Kinetik des Enzymsystems nur durch das Verhältnis der Gaskonzentrationen, nicht durch deren absolute Größe bestimmt; ohne photodissoziierendes Licht ist die Voraussetzung $k_{12} \ll k_{21}$ bei nicht allzu kleinen CO-Konzentrationen gut erfüllt.

Die Wechselzahl ("turnover number")

In Kapitel 2 haben wir auf die kinetische Bedeutung der turnover number als mittlere "Umlaufgeschwindigkeit" der Enzyme im Zyklus hingewiesen. Mit der quantitativen Formulierung des Enzymzyklus können wir einen Ausdruck für die Wechselzahl angeben.

Die Wechselzahl ist als die Zahl der umgesetzten Substratmoleküle je aktivem Enzymmolekül je Zeiteinheit definiert. Für das Cytochrom P-450 gilt also die allgemeine Formulierung

$$\frac{d}{dt} P = t_n \cdot (Fe)_{tot} \quad (5.17)$$

Für die aktiven Enzymmoleküle wurde die Schreibweise der Gl. (5.6a) übernommen, t_n bezeichnet die Wechselzahl (turnover number). Die Produktrate dP/dt ergibt sich aus dem Modellzyklus: mit Gl. (5.7) erhalten wir für t_n den Ausdruck

*) "im wesentlichen" ist auf die Zeit bezogen: das Gleichgewicht stellt sich nach einer kurzen Relaxationszeit (Zeitkonstante $\sim (k_{23} + k_{21})^{-1}$) ein.

**) Diese qualitative Argumentation wird im Anhang B ausführlich diskutiert.

$$t_n = \frac{r_2 (Fe)_3}{(Fe)_{tot}} \quad (5.18a)$$

bzw. mit der Schreibweise von Gl. (9)

$$t_n = r_2 x_3 \quad (5.18b)$$

In Gl. (5.18) bezeichnen $(Fe)_3$ bzw. x_3 sinnvollerweise die (normierte) Konzentration des stationären Gleichgewichts. Die Größe x_3 im stationären Gleichgewicht $(x_3)_{G1}$ kann explizit angegeben werden.

Für die Berechnung von $(x_3)_{G1}$ gehen wir von einem kohlenmonoxid-freien Ansatz aus. Mit verschwindender Kohlenmonoxid-Konzentration verschwindet auch die Reaktionsstufe des Kohlenmonoxid-Komplexes, x_1 in Gl. (5.10). Für den kohlenmonoxid-freien Ansatz erhalten wir das Differentialgleichungssystem

$$\begin{aligned} \dot{x}_2 &= -k_{23} x_2 + k_{32} x_3 + r_1 x_4 \\ \dot{x}_3 &= k_{23} x_2 - (k_{23} + r_2) x_3 \\ \dot{x}_4 &= r_2 x_3 - r_1 x_4 \end{aligned} \quad (5.19)$$

Wir ersetzen x_2 durch Gl. (5.6b) und erhalten

$$\begin{aligned} \dot{x}_3 &= -(k_{23} + k_{32} + r_2) x_3 - k_{23} x_4 + k_{23} \\ \dot{x}_4 &= r_2 x_3 - r_1 x_4 \end{aligned} \quad (5.20)$$

woraus sich die stationären Lösungen für $\dot{x}_3 = \dot{x}_4 = 0$ ergeben:

$$\begin{aligned} (x_3)_{G1} &= r_1 \left\{ r_1 + r_2 + r_1 \frac{k_{32} + r_2}{k_{23}} \right\}^{-1} \\ (x_4)_{G1} &= r_2 \left\{ r_1 + r_2 + r_1 \frac{k_{32} + r_2}{k_{23}} \right\}^{-1} \end{aligned} \quad (5.21)$$

Mit dem Ergebnis der Gl. (5.21) für $(x_3)_{G1}$ können wir t_n explizit als Funktion der Parameter des Modellzyklus, der

kinetischen Konstanten der einzelnen Modell-Reaktionen, angeben

$$t_n = r_1 r_2 \left\{ r_1 + r_2 + r_1 \frac{k_{32} + r_2}{k_{23}} \right\}^{-1} \quad (5.22)$$

Die Wechselzahl wird im wesentlichen durch die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte r_1 und r_2 festgelegt. Die Konstanten r_1 , r_2 und k_{32} , die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Sauerstoff-Komplexes, sind von der Größenordnung 1 s^{-1} , die Geschwindigkeitskonstante der Sauerstoffanlagerung liegt in der Größenordnung 100 s^{-1} ; der dritte Term im Nenner des Ausdrucks Gl. (5.22) kann also gegenüber den beiden ersten vernachlässigt werden

$$r_1 + r_2 \gg r_1 \frac{k_{32} + r_2}{k_{23}}$$

so daß sich für t_n in guter Näherung der Ausdruck ergibt

$$t_n \simeq \frac{r_1 r_2}{r_1 + r_2} \quad (5.23)$$

Der relative Produktzuwachs

In Kapitel 2 haben wir die allgemeine analytische Form der Produktbildung angegeben; der Ausdruck

$$\Delta P = \int_0^{\tau} p \cdot \Delta X^h(t) dt + \int_0^{\tau} p \cdot \Delta X^d(t) dt \quad (2.3)$$

beschreibt den Produktzuwachs als Folge einer Bestrahlung der Probe.

Im Modellzyklus ist die Produkt-Zeit-Funktion durch Gl. (5.8) gegeben. Wir verwenden diese Gleichung und formulieren damit den Produktzuwachs im Modell

$$\Delta P^{(0)} = r_2 \cdot \int_0^{\tau} \Delta(\text{Fe})_3^h(t) dt + r_2 \cdot \int_0^{\tau} \Delta(\text{Fe})_3^d(t) dt \quad (5.24)$$

Der Index (o) kennzeichnet $\Delta P^{(o)}$ als eine Modell-Größe im Unterschied zum experimentellen Produktzuwachs ΔP .

Wie in Gl. (2.3) bezeichnen die Indizes h und d den Bestrahlungszustand des enzymatischen Ansatzes: hell (h) oder dunkel (d). $\Delta(\text{Fe})_3$ bedeutet die Differenz zum stationären Dunkelzustand $(\text{Fe})_{3\text{Gl}}^{\text{d}}$

$$\Delta(\text{Fe})_3^{\text{h,d}}(t) = (\text{Fe})_3^{\text{h,d}}(t) - (\text{Fe})_{3\text{Gl}}^{\text{d}} .$$

Die Integration erstreckt sich einmal über die Hellzeit τ und zum anderen über die Dunkelzeit ϑ . Die Anfangsbedingungen für die Integrationen ($t = 0$) sind jeweils durch die "Vorgeschichte" des Systems festgelegt. Wird der enzymatische Ansatz mehrfach hintereinander belichtet, so berücksichtigen wir die "Vorgeschichte" durch einen Index i an der Reaktionsstufe $(\text{Fe})_3$

$$\Delta P^{(o)}(\tau, \vartheta, n) = \sum_i^n \left\{ \int_0^\tau \Delta(\text{Fe})_{3,i}^{\text{h}}(t) dt + \int_0^\vartheta \Delta(\text{Fe})_{3,i}^{\text{d}}(t) dt \right\} \quad (5.25)$$

Mit den Gleichungen (5.24) und (5.25) können wir entsprechend der Definition von Gl. (4.1) den relativen Produktzuwachs im Modellzyklus angeben

$$\tilde{\Delta P}^{(o)}(\tau, \vartheta, n) = \frac{\sum_i^n \left\{ \int_0^\tau \Delta x_{3,i}^{\text{h}}(t) dt + \int_0^\vartheta \Delta x_{3,i}^{\text{d}}(t) dt \right\}}{\int_0^{\tau_0} \Delta x_3^{\text{h}}(t) dt + \int_0^{\vartheta \rightarrow \infty} \Delta x_3^{\text{d}}(t) dt} \quad (5.26)$$

wobei Nenner und Zähler mit dem Faktor $1/(\text{Fe})_{\text{tot}}$ multipliziert wurden, um gemäß Gl. (5.9) die normierten Reaktionsstufen zu erhalten. Die Reaktionsstufe Δx_3 ist durch das Differentialgleichungssystem (5.11) bzw. (5.13) gegeben, womit auch der relative Produktzuwachs im Modellzyklus gemäß Gl. (5.26) vollständig bestimmt ist.

Eigenschaften der Modellfunktion $\tilde{\Delta P}^{(0)}$

Mit der Formulierung des relativen Produktzuwachses als Funktion von Modellgrößen können wir die Eigenschaften des Modellsystems im Vergleich zu den experimentellen Ergebnissen unmittelbar angeben.

Für bestimmte feste Werte der Parameter des Modellsystems zeigt Abb. 5-3 die Funktion $\tilde{\Delta P}^{(0)}(\tau)$ im Bereich $0 \leq \tau \leq 3$ s bei verschiedenen Verhältnissen von Kohlenmonoxid zu Sauerstoff. Wir vergleichen die Modellfunktion mit den charakteristischen Merkmalen der Produktfunktion (Abschn. 5.1) und erhalten die folgenden Resultate:

- Der Verlauf der Modellfunktion gleicht qualitativ dem der Produktfunktion: die Kurven (Abb. 5-3) wachsen monoton mit τ bei monoton auf einen stationären Endwert fallender Steigung; die Kurven zeigen kein Plateau oder die Andeutung eines Plateaus (Wendepunkt).
- Die Modellfunktion reproduziert den "sprunghaften Produktanstieg" bei kleinen Belichtungszeiten nicht. Für die Modellfunktion gilt in jedem Fall

$$\tilde{\Delta P}^{(0)}(0) = 0,$$

so daß wir sagen können, daß die schnelle Komponente der Anfangskinetik durch die Modellfunktion nicht dargestellt werden kann.

- Der Einfluß der mehrfachen Belichtung auf die Produktfunktion, in der Darstellung durch die Funktion $y(\tau)$ die Abhängigkeit des Parameters B von der Anzahl der Bestrahlungen und der Dunkelzeit zwischen je zwei Bestrahlungen, wird von der Modellfunktion ebenfalls nicht reproduziert. Der Modellzyklus ergibt für $\Delta P^{(0)}$ bei einer Dunkelzeit von $\tau^* = 5$ s nur eine geringfügige Abhängigkeit von n, für größere Dunkelzeiten ($\tau^* = 10$ s, 20 s) wird $\Delta P^{(0)}$ praktisch unabhängig von n^{*)}.

^{*)} Letztere Aussage bezieht sich auf die reduzierten Werte gemäß Gl. (4.8): $\Delta P^{(0)}(\tau, \tau^*, n)/n$.

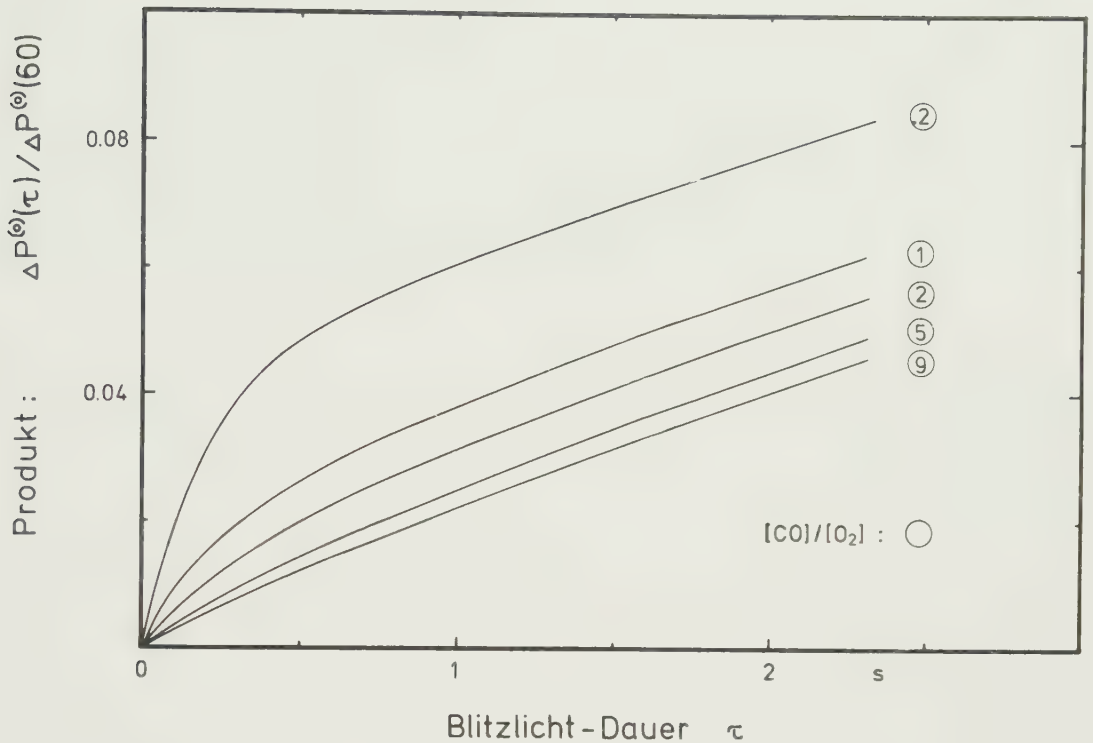


Abb. 5-3: Modellfunktion $\tilde{\Delta P}^{(o)}(\tau)$ für verschiedene CO : O₂ Verhältnisse im Bereich 0 - 3 s.

Die Funktion $\tilde{\Delta P}^{(o)}$ wurde mit folgenden Parameterwerten berechnet, die an die Werte aus Tab. 5-1 angelehnt sind: $r_1 = 0.5 \text{ s}^{-1}$, $r_2 = 0.7 \text{ s}^{-1}$, $k_{12} = 0.2 \text{ s}^{-1}$, $k^* = 6 \text{ s}^{-1}$, $k_{32} = 3 \text{ s}^{-1}$; die CO-abhängigen Parameter erhalten die Werte $v = 0.5 \cdot C$, $k_{21} = 23 \cdot C \text{ s}^{-1}$, wobei der Faktor C das CO : O₂ Verhältnis der jeweiligen Kurve angibt.

- In der normierten Darstellung zeigt die Modellfunktion qualitativ dieselbe Abhängigkeit vom $\text{CO} : \text{O}_2$ Verhältnis wie die Produktfunktion (Abb. 5-3): mit sinkendem CO-Anteil (bei festem O_2 -Gehalt) erhält die Anfangsphase der Modellfunktion ein wachsendes Gewicht gegenüber der stationären Phase. Wie sich später zeigt (Abschn. 5.5) wird die Kohlenmonoxid-Abhängigkeit auch quantitativ recht gut mit dem Modell reproduziert.

Der allgemeine Verlauf der Modellfunktion und das Verhalten bei variierenden Gasgemischen $\text{CO} : \text{O}_2$ weisen darauf hin, daß das Modell geeignet erscheint, den Cytochrom P-450-Zyklus darzustellen; dieses Resultat wird vor allem durch die Reproduzierbarkeit des Kohlenmonoxid-Einflusses, der ja allein eine Eigenschaft des Cytochroms und nicht des Enzymsystems ist, unterstützt. Die Merkmale, die das Modell nicht reproduziert, führen wir auf das kinetische Verhalten des Enzymsystems zurück, das mit dem Modellansatz, der sich auf die Darstellung des Cytochrom P-450-Zyklus beschränkt, nicht erfaßt werden kann. Die Erweiterung des Modells auf das gesamte Enzymsystem diskutieren wir im folgenden Abschnitt.

5.4 Die Dunkelrelaxation des Enzymsystems: ein Modell für das Enzymsystem

Die zwei kinetischen Systeme im Enzymsystem

Wie in Kapitel 2 ausgeführt wird, sind mit dem Beginn und dem Ende der Belichtung des enzymatischen Ansatzes zwei stationäre Zustände des Enzymsystems definiert: der "Hell-Zustand" und der "Dunkel-Zustand". Durch das An- und Abschalten des Lichtes wird der - jeweils neue - stationäre Zustand "eingeschaltet", gegen den das Enzymsystem von seinem momentanen Zustand aus - dem Zustand zum Zeitpunkt des Schaltens - relaxiert. Analog zu den stationären Zuständen können wir von einer "Hell-Relaxation" und einer "Dunkel-Relaxation" sprechen.

Die Relaxation des Enzymsystems im Hellen wird durch die deskriptive Funktion $y(\tau)$ (Gl. (4.4)) dargestellt. Der e-funktionale Term dort

$$\exp(-\alpha \tau)$$

beschreibt den Übergang des Systems zum stationären Hellzustand, die Konstante α hat die Bedeutung einer phänomenologischen "Hell-Relaxationskonstante" des Enzymsystems. Wie die Tabellen 4-8 bis 4-11 zeigen, liegt die Relaxationskonstante (hell) im Bereich

$$1 \text{ s}^{-1} \lesssim \alpha \lesssim 2 \text{ s}^{-1} \quad (5.27)$$

das entspricht einer Halbwertszeit der Relaxation (hell) von ungefähr 0.5 s.

Im Dunkeln relaxiert das Enzymsystem wesentlich langsamer, wie sich aus der Betrachtung des konstanten Terms B der Funktion $y(\tau)$ ergibt (Tab. 4-11). Selbst nach 20 s hat das Enzymsystem seinen stationären Dunkel-Zustand noch nicht erreicht (Tab. 4-10); daraus läßt sich eine Halbwertszeit für die Dunkel-Relaxation abschätzen, die mindestens eine Größenordnung über dem Halbwert der Hell-Relaxation liegt. Der Unterschied

in den beiden phänomenologischen Relaxationskonstanten (hell / dunkel) könnte auf die Wirkung der Belichtung, durch die an einer Stelle des Enzymsystems eine Geschwindigkeitskonstante - die Dissoziationskonstante des Cytochrom P-450-Kohlenmonoxid-Komplexes - erheblich vergrößert wird, zurückgeführt werden. Jedoch zeigt die Rechnung am Modellzyklus, daß die Photodissoziation die Relaxation des Enzymsystems insgesamt gegenüber der Dunkel-Relaxation nur wenig beschleunigt und in keinem Fall die beobachtete Differenz zwischen Hell- und Dunkel-Relaxation erklären kann.

Setzen wir voraus, daß durch die Belichtung des enzymatischen Ansatzes nur die Photodissoziation des Kohlenmonoxid-Komplexes bewirkt wird, die übrigen Komponenten des Enzymsystems jedoch unbeeinflusst bleiben, so müssen wir das beobachtete Relaxationsverhalten im Hellen und im Dunkeln zwei verschiedenen kinetischen Systemen zuordnen. Das eine System wird durch den Modellzyklus (Gl. (5.4)) und das zugehörige Differentialgleichungssystem (Gl. (5.10)) beschrieben; wir bezeichnen dieses System als "System I". Das andere System, "System II", wird nicht durch die Differentialgleichungen des Modellzyklus dargestellt; dieses System relaxiert "schnell" im Hellen^{*)} und "langsam" im Dunkeln.

Modell und Auswertung der Dunkel-Relaxation

Der Einfluß der Dunkel-Relaxation des Enzymsystems auf den Produktzuwachs (s. Gl. (4.1)) stellt sich in der deskriptiven Funktion $y(\tau)$ (Gl. (4.4)) in deren konstanten Term B dar wie in Kap. 4 ausgeführt wurde: der Term B ist im allgemeinen eine Funktion der Anzahl n der Belichtungen und der Dunkelzeit τ zwischen ihnen

$$B = B(\tau, n) \quad (5.28)$$

^{*)} Die "schnelle" Hellrelaxation ergibt sich aus dem Verlauf der Hellrelaxation des Enzymsystems, der keine langsame Komponente erkennen läßt; die Hellrelaxation des System II ist vergleichbar der des System I.

Im folgenden entwickeln wir eine analytische Darstellung der Funktion $B(\mathcal{I}, n)$, die zugleich eine quantitative Beschreibung der Dunkel-Relaxation des Enzymsystems impliziert.

Analog zu dem experimentellen Verfahren stellen wir B als Summe von n aufeinanderfolgenden Beiträgen dar:

$$\begin{aligned} B(\mathcal{I}, n) &= B_0 + B_1(\mathcal{I}) + \dots + B_0 + B_n(\mathcal{I}) \\ &= nB_0 + B_1(\mathcal{I}) + \dots + B_n(\mathcal{I}) \end{aligned} \quad (5.29)$$

Die Darstellung (5.29) entspricht der Hypothese der zwei kinetischen Systeme, die wir aus den obigen Überlegungen gefolgert haben. Der Term B_0 repräsentiert den Beitrag des schnellen Systems, dessen Dunkel-Relaxation innerhalb der experimentellen Dunkelzeiten ($\mathcal{I} \gg 5$ s) im wesentlichen abgeschlossen ist, weswegen der Term B_0 für die betrachteten Dunkelzeiten nicht mehr von $\mathcal{I}$ abhängt - das System I liefert bei jeder Belichtung denselben Beitrag B_0 . Die Terme B_1 bis B_n stellen die Beiträge des Systems II dar und bilden der langsamen Dunkel-Relaxation dieses Systems wegen den von $\mathcal{I}$ abhängigen Anteil in der Darstellung (5.29).

Die erste Belichtung beginnt im stationären Dunkelzustand des Systems; der Hell-Anteil des Terms $B_1(\mathcal{I})$ hängt also nicht von $\mathcal{I}$ ab. Ebenso ist der Dunkel-Anteil des Terms $B_n(\mathcal{I})$ von $\mathcal{I}$ unabhängig, da das Enzymsystem nach der letzten Belichtung wieder vollständig in den stationären Dunkelzustand relaxiert:

$$\begin{aligned} B_1(\mathcal{I}) &= B_1^h + B_1^d(\mathcal{I}) \\ B_n(\mathcal{I}) &= B_n^h(\mathcal{I}) + B_n^d \end{aligned} \quad (5.30)$$

wobei die Indizes h und d den Hell- bzw. den Dunkel-Anteil bezeichnen. Da bei jeder Belichtung der stationäre Hell-Zustand erreicht wird - der Term B (Gl. (5.28)) beschreibt den

stationären Hell-Zustand - sind die Zustände des Enzymsystems zu Beginn und am Schluß der übrigen Belichtungen ($i = 2, \dots, n-1$) wohl definiert und jeweils identisch. Daraus folgt für die Beiträge $B_i(\mathcal{I})$ ($i = 2, \dots, n-1$):

$$B_2(\mathcal{I}) = B_3(\mathcal{I}) = \dots = B_{n-1}(\mathcal{I}) = B^*(\mathcal{I}) \quad (5.31)$$

Wir fassen in Gl. (5.30) den Hell-Anteil von $B_1(\mathcal{I})$ und den Dunkel-Anteil von $B_n(\mathcal{I})$ zu einer von $\mathcal{I}$ unabhängigen Konstanten B_1 zusammen, und ebenso die beiden übrigen von $\mathcal{I}$ abhängigen Terme zu der Größe $B^*(\mathcal{I})$ (s. Gl. (5.31)):

$$\begin{aligned} B_1^h + B_n^d &= B_1 \\ B_1^d(\mathcal{I}) + B_n^h(\mathcal{I}) &= B^*(\mathcal{I}) \end{aligned} \quad (5.32)$$

Die Konstante B_1 stellt den Beitrag des System II bei einmaliger Belichtung ($n = 1$) dar und hängt somit nicht von $\mathcal{I}$ ab. Der Betrag von B_1 ist gleich der - relativen - Größe des System II (siehe unten).

Mit Gl. (5.30), (5.31) und (5.32) vereinfacht sich die Darstellung (5.29) zu

$$B(\mathcal{I}, n) = nB_0 + B_1 + (n - 1) B^*(\mathcal{I}) \quad (5.33)$$

Gl. (5.33) gibt die Abhängigkeit der Funktion $B(\mathcal{I}, n)$ von n explizit an. Das Dunkel-Relaxationsverhalten des System II wird durch die Funktion $B^*(\mathcal{I})$ beschrieben. In einem ersten Ansatz nehmen wir an, daß $B^*(\mathcal{I})$ mit wachsendem $\mathcal{I}$ e-funktional gegen B_1 relaxiert

$$B^*(\mathcal{I}) = B_1 \left[1 - \exp(-\mathcal{I}) \right] \quad (5.34)$$

Die in Gl. (5.34) formal eingeführte Relaxationskonstante $\mathcal{I}$ identifizieren wir mit der phänomenologischen Dunkel-Relaxationskonstante des postulierten System II.

Mit dem Ansatz (5.34) ergibt sich für $B(\tau, n)$ aus Gl. (5.33)

$$B(\tau, n) = nB_0 + B_1 \left[n - (n-1) \exp(-\rho \tau) \right] \quad (5.35)$$

Der Ausdruck (5.35) für $B(\tau, n)$ enthält die drei Parameter B_0 , B_1 und ρ . Wir normieren die Funktion $B(\tau, n)$ (Gl. (5.35)) auf ihren Funktionswert bei $\tau = 5$ s und $n = 10$, $B(5, 10)$, und reduzieren damit die Anzahl der Parameter. Für die normierte Funktion ergibt sich folgender Ausdruck, wobei wir analog zu den Tabellen 4-10 und 4-11 die reduzierte Funktion $B^r(\tau, n)$ (s. Gl. (4.9)) einführen:

$$\frac{B^r(\tau, n)}{B^r(5, 10)} = \frac{B_0/B_1 + 1 - (1 - \frac{1}{n}) \cdot \exp(-\rho \tau)}{B_0/B_1 + 1 - 0.9 \exp(5 \rho)} \quad (5.36)$$

Die normierte Funktion (5.36) enthält neben dem Parameter ρ nur einen weiteren Parameter, das Verhältnis von B_0 zu B_1 ; der Ausdruck B_0/B_1 ist das Verhältnis des Beitrags des System I zu dem des System II bei einmaliger Belichtung (siehe oben) und ist damit gleich dem Größenverhältnis der beiden Systeme selbst.

Die Parameter ρ und B_0/B_1 bestimmen sich aus der Anpassung der Funktion (5.36) an die Meßwerte B^r der Tabellen 4-10 und 4-11, wobei für die Auswertung die B^r der beiden Meßreihen analog zur Funktion (5.36) auf den jeweiligen Wert B^r für $\tau = 5$ s und $n = 10$ normiert werden. Die Abb. 5-4 zeigt die angepaßte Funktion (5.36) in Abhängigkeit von τ für drei verschiedene Werte für n und die normierten Meßwerte. Die Normierung legt die Funktion für $\tau = 5$ und $n = 10$ auf den Funktionswert 1 fest, im übrigen wird der Funktionsverlauf durch die Werte der Parameter bestimmt. Aus der Abb. 5-4 geht anschaulich hervor, daß sich das Relaxationsverhalten des Terms B (Gl. (5.28)) sehr gut durch den gewählten Ansatz (5.29) und (5.34) darstellen läßt; dabei ergeben sich für die Parameter die Werte

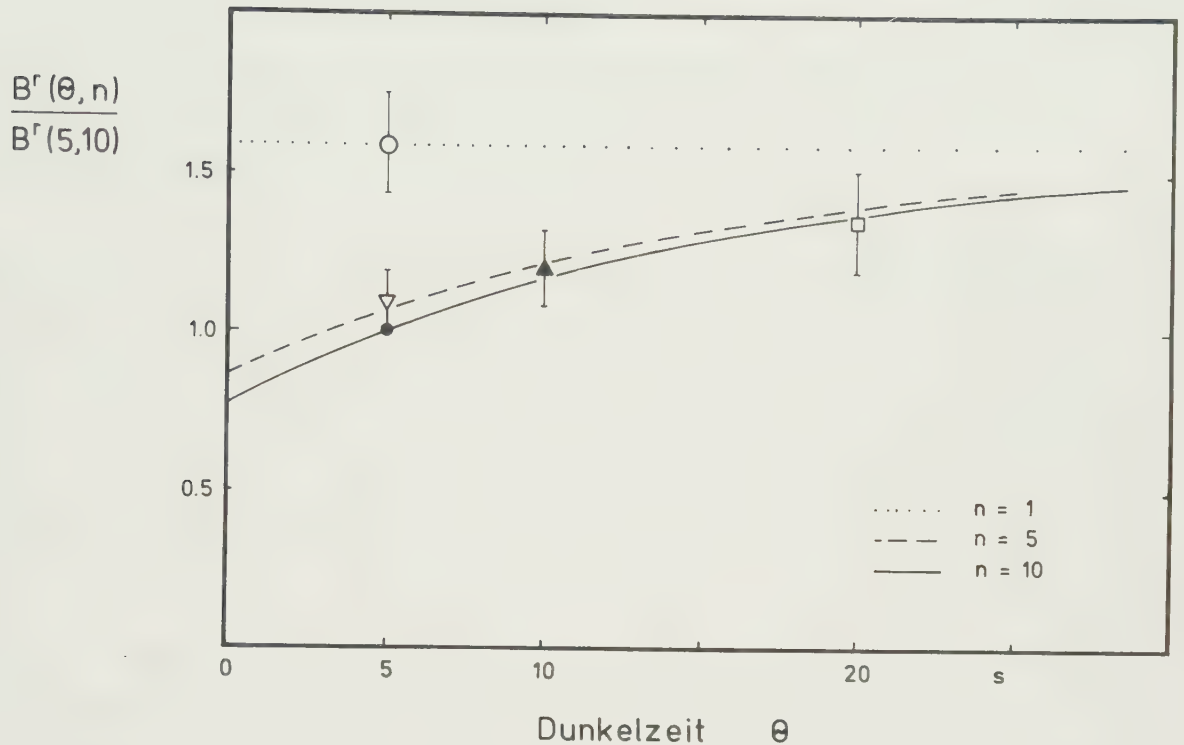


Abb. 5-4: Die Funktion $B(\gamma, n)$ in normierter Darstellung, reduziert auf $n = 1$.

Die Abbildung zeigt die normierten Meßwerte ($\circ$: $n = 1$, $\nabla \square$: $n = 5$, $\bullet \blacktriangle$: $n = 10$ - vgl. Abb. 4-5 und 4-6) und den "best fit" der Funktion für die drei Parameterwerte $n = 1, 5$ und 10 . Die Normierung legt den Funktionswert $B(5, 10)$ auf den Wert 1 fest ($\bullet$).

$$\rho = 0.07 \pm 0.05$$

(5.37)

$$B_0/B_1 = 0.7 \pm 0.4$$

Die relativ großen Streubreiten, $\sigma \approx 70\%$, resultieren aus der geringen Anzahl von Meßpunkten, die die Anpassung nur wenig einengen.

Ein Vergleich der phänomenologischen Dunkel-Relaxationskonstanten ρ (5.37) mit der Konstanten α der Hell-Relaxation (5.27) bestätigt den geschätzten Unterschied (s. oben) von einer Größenordnung und mehr. Bemerkenswert ist das Ergebnis für den Parameter B_0/B_1 , das zeigt, daß der Term B (bei einmaliger Bestrahlung, $n = 1$) zu 40% vom System I (B_0) und zu 60% vom System II (B_1) gebildet wird.

Enzymatische Grundlage der zwei kinetischen Systeme

Bevor wir die möglichen Ursachen der zweiphasigen Dunkel-Relaxation des Enzymsystems diskutieren, stellen wir einen herausragenden Aspekt dieser Relaxation dar: die starke Parallelität zwischen der Kinetik der Dunkel-Relaxation des Enzymsystems einerseits und der Reduktion des Cytochrom P-450 andererseits.

Die Grundlage für den Vergleich der Dunkel-Relaxationskinetik des Enzymsystems und der Reduktionskinetik des Cytochrom P-450 bilden die im wesentlichen gleichen experimentellen Bedingungen, unter denen die Kinetiken bestimmt wurden: beide Meßverfahren benutzen den Cytochrom P-450-Kohlenmonoxid-Komplex als den Gleichgewichtszustand, in den das System jeweils relaxiert. Im Fall der Reduktion ist dieser Zustand durch die Anaerobizität des Ansatzes eindeutig bestimmt; im Fall der hiesigen Experimente haben wir es mit demselben Zustand zu tun, da durch die Meßmethode hier nur Kohlenmonoxid-Komplexe des Cytochroms erfaßt werden. Beide Experimente also, die Untersuchung der Reduktion und die Untersuchung der Dunkel-

Relaxation, zeigen die Relaxation des Enzymsystems in ein und denselben Endzustand, allerdings mit unterschiedlichen Anfangsbedingungen: der Zustand der oxidierten Cytochrom P-450-(Substrat)-Komplexe im Fall der Reduktion und der stationäre Hell-Zustand im anderen Fall.

Alle Messungen der Cytochrom P-450-Reduktion zeigen einen zweiphasigen Verlauf (6 / 8 / 9 / 10 / 15): die Reduktionskinetik enthält eine schnelle und eine langsame Komponente, die sich durch zwei Exponentialfunktionen beschreiben lassen. Man erhält zwei Geschwindigkeitskonstanten, die sich um etwa eine Größenordnung unterscheiden. Die Größe der beiden Geschwindigkeitskonstanten, ebenso wie der Anteil der Reduktion, der auf die beiden Komponenten entfällt, wird wesentlich durch das beteiligte Cytochrom P-450 und das jeweils im Ansatz befindliche Substrat beeinflusst. Der Anteil der schnellen Komponente variiert zwischen 40% und 60% (in einem Fall auch 80%), die Geschwindigkeitskonstante der langsamen Komponente liegt im Bereich von 0.1 s^{-1} bis 0.4 s^{-1} (10). Parallel zu der Cytochrom P-450-Reduktion zeigt die Dunkel-Relaxation des Enzymsystems ebenfalls einen zweiphasigen Verlauf: die schnelle Komponente entspricht dem "System I" mit dem Anteil B_0 , die langsame Komponente dem - allein beobachteten - System II mit dem Anteil B_1 und der Relaxationskonstanten ρ . Sowohl ρ als auch der Anteil B_0 stimmen quantitativ mit den für die Reduktion zitierten Werten überein.

Die weitgehende Parallelität zwischen dem Verlauf der Cytochrom P-450-Reduktion einerseits mit dem Dunkel-Relaxationsverlauf andererseits führt zu dem Schluß, daß die langsamen Komponenten in den beiden Kinetiken dieselbe enzymatische Grundlage haben. In der langsamen Komponente der Dunkel-Relaxation des Enzymsystems sehen wir also die langsame Komponente der Cytochrom P-450-Reduktion.

Offensichtlich tritt die langsame Komponente in der Reduktions- bzw. Relaxationskinetik gerade durch die Präsenz des Kohlenmonoxids in Erscheinung; erst durch die Unterbrechung

des Zyklus nach der Cytochrom P-450-Reduktion kann sich ein erheblicher Anteil an Cytochrom P-450-Kohlenmonoxid-Komplexen gemäß der langsamen Komponente der Reduktionskinetik bilden. Umgekehrt bedeutet dies, daß in aktiven, CO-freien enzymatischen Ansätzen jeweils nur der Teil der Cytochrom P-450-Moleküle, der schnell reduziert wird, am Substratumsatz beteiligt ist. Wir können also formal zwei Gruppen von Cytochrom P-450 Molekülen definieren, die sich durch ihre Reduktionseigenschaften unterscheiden^{*)}; dabei bleibt vorerst offen, worin die Ursachen für die unterschiedlichen Eigenschaften bestehen.

Mit diesem Ergebnis können wir die zwei kinetischen Systeme der flash photolysis-Experimente auf zwei Cytochrom P-450-Gruppen zurückführen. Die Charakteristika der zwei Systeme gelten ebenso für die beiden Cytochrom P-450-Gruppen. Im Bild der Cytochrom-Moleküle können wir das System II als einen "pool" von Cytochrom P-450-Kohlenmonoxid-Komplexen beschreiben, der bei Belichtung sukzessive "entleert" wird und sich im Dunkeln gemäß der langsamen Kinetik regeneriert. Im stationären Hell-Zustand sind die Cytochrom-Moleküle aus diesem pool nicht am Substratumsatz beteiligt (siehe oben).

Im Unterschied zu der Reduktion des Cytochrom P-450 beruht die zweiphasige Kinetik der Dunkelrelaxation des Enzymsystems ausschließlich auf dem Verhalten der Cytochrom P-450-Substrat-Komplexe. Unabhängig von dem Einfluß, den das Substrat auf die Reduktionskinetik des Cytochrom P-450 insgesamt hat (siehe oben), verläuft - nach den obigen Ausführungen - die Reduktion der Cytochrom-Substrat-Komplexe für sich zweiphasig. Ein Erklärungsmodell für die Zweiphasigkeit kann also nicht von dem Substrateinfluß ausgehen, wie DIEHL et. al. es angeben (9), sondern muß die Ursache in anderen Eigenschaften der Cytochrome bzw. des elektronenübertragenden Systems suchen.

*) Wir betrachten in dieser Darstellung die Aktivität des Cytochrom P-450 bezüglich nur eines Substrats.

Wir wollen zwei Modellvorstellungen diskutieren. Eine mögliche Erklärung liegt in der Membranstruktur des endoplasmatischen Retikulums, speziell in der Anordnung der Cytochrom P-450 Moleküle und der zugehörigen Reduktase. Auf je ein Reduktasemolekül entfallen 10 - 25 Cytochrom P-450 Moleküle, die nach der gängigen Vorstellung in einer festen räumlichen Anordnung ("rigid model") oder lockeren, variablen Häufungen ("non-rigid-semifluid-model") um das Reduktasemolekül gruppiert sind (36 / 37).

Dabei bilden sich zwei Gruppen von Cytochrom-Molekülen heraus: die einen liegen in unmittelbarer Nähe zur Reduktase, die anderen Cytochrom-Moleküle sind weiter entfernt. Diese Geometrie des Reduktasesystems begründet gemäß des einen Erklärungsmodells die zweiphasige Reduktion des Cytochrom P-450; während die Cytochrom P-450 Moleküle in der Nähe der Reduktase unmittelbar mit Elektronen versorgt werden, erfordert die Reduktion der weiter entfernt liegenden Cytochrom-Moleküle den Transfer der Elektronen dorthin (rigid model) bzw. das Wandern der Cytochrom-Moleküle in die Nähe der Reduktase (non-rigid-model) - eventuell zusätzlich mit einem Transfer der Elektronen.

Der Transfer der Elektronen bzw. die Diffusion der Cytochrom-Moleküle bildet die langsame Phase der Reduktion der Cytochrom P-450 Moleküle. Dieses Modell wird durch den Befund unterstützt, daß die Reduktionsrate des Cytochrom P-450 positiv mit dem Verhältnis der Reduktasemoleküle zu den Cytochrom-Molekülen korreliert (14). Dagegen stehen allerdings die Ergebnisse aus Untersuchungen an Liposomen (15), die die Zweiphasigkeit der Reduktion auch nach der Auflösung der Liposomvesikel zeigen - also auch ohne Membranstruktur. Letzterer Befund reflektiert möglicherweise die schon eingangs erwähnte unphysiologische Reaktion, die die Bildung des Cytochrom P-450-Kohlenmonoxid-Komplexes darstellt.

Unter physiologischen Bedingungen erhält das Cytochrom P-450 zwei Elektronen von der Cytochrom P-450-Reduktase, eines vor

und eines nach der Bildung des Sauerstoffkomplexes^{*)}. Die Reduktase erhält ihrerseits vom NADPH in einem einzigen Schritt zwei Elektronen, die von einem der beiden Flavine aufgenommen werden (38).

Die folgenden Schritte des Elektronentransfers und vor allem den Mechanismus der Wechselwirkung von Reduktase und Cytochrom kennen wir nicht. Um im Enzymsystem aktiv zu werden, muß die Reduktase einfach reduziert sein (39); es läßt sich ein Mechanismus vorstellen, nach dem die Reduktase die beiden Elektronen, die eines ihrer Flavine aufgenommen hat, über das andere Flavin sukzessive an das Cytochrom abgibt^{**)}. Dieser Weg bietet sich als "ökonomisch" an, zumal eine intermolekulare Komproportionierung nur langsam erfolgt (38). Wird der vollständige Elektronen-Transfer unterbrochen, bleibt die Reduktase in einem zweifach reduzierten Zustand zurück, der die Ursache für die langsame Phase in der Reduktion des Cytochrom P-450 darstellen könnte - sei es, daß die Wechselwirkung der zweifach reduzierten Reduktase mit dem Cytochrom erschwert oder verhindert wird, sei es, daß die Aufnahme eines weiteren Elektronenpaares erschwert oder verhindert wird.

Letzteres Erklärungsmodell ist wie gesagt experimentell kaum abgesichert; solange wir jedoch kein konkretes Wissen über den Mechanismus der Reduktion des Cytochrom P-450 - die Wechselwirkung der Reduktase mit dem Cytochrom - haben, müssen wir die potentielle Änderung des Reduktionsmechanismus in Gegenwart von Kohlenmonoxid berücksichtigen. Abschließend sei noch angemerkt, daß beide hier diskutierten Modelle den Einfluß des Substrats auf sowohl die schnelle als auch die langsame Phase der Reduktion (6 / 10 / 15) unmittelbar ergeben, wenn wir die Substratwirkung in einer allgemeinen Beschleunigung der Reduktase-Cytochrom-Wechselwirkung ansetzen.

^{*)} Wir beschränken die Diskussion auf das Leber-Monooxygenasesystem, in dem die Reduktase offenbar direkt mit dem Cytochrom P-450 wechselwirkt.

^{**)} siehe dazu die Untersuchungen von SIEGEL et al. (40)

5.5 Die Auswertung an Hand des erweiterten Modells: Die Parameter des Modells

In diesem letzten Abschnitt zeigen wir die Anpassung des oben aufgestellten Modells für den Cytochrom P-450-Zyklus an die Daten aus den flash photolysis-Experimenten und diskutieren die Ergebnisse dieser Anpassung für die Modellparameter.

Die erweiterte Modellfunktion $\Delta P^{(1)}$

Wie wir im vorigen Abschnitt gesehen haben, können wir das kinetische Verhalten des Enzymsystems bei den gegebenen experimentellen Bedingungen durch zwei kinetische Systeme beschreiben. Die experimentelle Produktfunktion ΔP bzw. $\tilde{\Delta P}$ wird demnach in einer ersten Näherung durch den Ansatz

$$\Delta P^{(1)} = \Delta P_I + \Delta P_{II} \quad (5.38)$$

dargestellt: der Produktzuwachs $\Delta P^{(1)}$ setzt sich aus den Beiträgen der beiden Systeme, ΔP_I und ΔP_{II} , zusammen. Der Index (1) bezeichnet analog zum Index (o) (Gl. (5.24)) die Modellgröße zur Unterscheidung von der experimentellen Größe ΔP ohne Index.

Entsprechend der Definition des normierten Produkts (Gl. 4.1)) gilt für Normierung von $\Delta P^{(1)}$

$$\tilde{\Delta P}^{(1)} = \Delta P^{(1)} / \Delta P^{(1)}_{(60)} \quad (5.39a)$$

und mit Gl. (5.38)

$$\tilde{\Delta P}^{(1)} = \frac{\Delta P_I}{\Delta P^{(1)}_{(60)}} + \frac{\Delta P_{II}}{\Delta P^{(1)}_{(60)}} \quad (5.39b)$$

womit die Normierung für die Summanden von Gl. (5.38) gezeigt wird*).

*) Siehe nächste Seite

Das eine System, System I, haben wir durch den Modellzyklus und das Differentialgleichungssystem beschrieben; der Produktbeitrag dieses Systems wird im Modell durch die Funktion $\Delta P^{(0)}$ angegeben

$$\Delta P_I \simeq \Delta P^{(0)} \quad (5.40)$$

$\Delta P^{(0)}$ kann man als die nullte Näherung für die Produktfunktion ΔP ansehen. Die Produktbeiträge der beiden Systeme, ΔP_I und ΔP_{II} , und damit auch die Modellfunktion $\Delta P^{(1)}$ sind Funktionen der Belichtungsdauer τ , und - bei Mehrfachbelichtungen - der Anzahl n der Belichtungen und der Dunkelzeit ϑ zwischen je zwei Belichtungen

$$\Delta P_I = \Delta P_I(\tau, \vartheta, n)$$

$$\Delta P_{II} = \Delta P_{II}(\tau, \vartheta, n).$$

Die Funktion $\Delta P^{(0)}$ erwies sich bei Mehrfachbelichtungen für $\vartheta = 5$ s als praktisch unabhängig von n (siehe oben). Wir können somit für ΔP_I in guter Näherung schreiben

$$\Delta P_I(\vartheta, \tau, n) \simeq n \cdot \Delta P_I(\tau) \quad (5.41)$$

Die Eigenschaften des anderen kinetischen Systems, System II, haben wir im vorangegangenen Abschnitt diskutiert. Der Produktbeitrag dieses Systems entspringt einem Reservoir, dem "pool" der Cytochrom P-450 Moleküle des System II; dieses Reservoir wird im Hellen (bei Belichtung) entleert und füllt sich wieder in den Dunkelphasen. Die Dunkelrelaxation des System II haben wir beobachtet und mit dem Ansatz für die

*) Für die Normierung gilt das Distributivgesetz nicht:
 $\widetilde{\Delta P}^{(1)} \neq \widetilde{\Delta P}_I + \widetilde{\Delta P}_{II}$, denn nach Definition ist
 $\widetilde{\Delta P}_I = \Delta P_I / \Delta P_I(60)$. Vergl. Gl. (5.39b).

Funktion $B(\nu, n)$ (Gl. (5.29)) und einer phänomenologischen Relaxationskonstanten ρ (Gl. (5.34)) beschrieben. Der zweite Term in Gleichung (5.35)

$$B_1 [n - (n - 1) \exp(-\rho \nu)]$$

gibt - bis auf einen Normierungsfaktor - den Produktbeitrag des System II für den Übergang in den stationären Hell-Zustand, d.h. für die vollständige Entleerung des Reservoirs, an.

Für die Funktion ΔP_{II} im stationären Hell-Zustand gilt also

$$\Delta P_{II}(\tau, \nu, n) = f \cdot B_1 [n - (n-1) \exp(-\rho \nu)]; \tau \text{ "groß"} \quad (5.42)$$

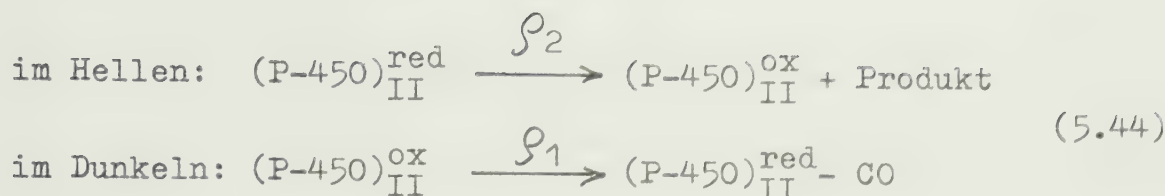
Mit dem Normierungsfaktor aus Gl. (5.39) erhalten wir die Funktion ΔP_{II} explizit in ν und n (τ "groß"):

$$\frac{\Delta P_{II}(\nu, n)}{\Delta P^{(1)}(60)} = B_1 [n - (n-1) \exp(-\rho \nu)] \quad (5.43)$$

Die Konstante B_1 hat, wie bereits erwähnt (siehe Gl. (5.32)), die Bedeutung der -relativen - Größe des Reservoirs (des System II).

Die Hellreaktion des System II, die Entleerung des Reservoirs, wird durch die Funktion $\Delta P_{II}(\tau)$ dargestellt. Über den Verlauf dieser Hellreaktion haben wir nur den indirekten Hinweis, daß die Hellrelaxation des Enzymsystems keine langsame Komponente aufweist (siehe Gl. (5.27)). Die Hellreaktion verläuft für die Cytochrom-Moleküle aus dem Reservoir - den Molekülen des System II - augenscheinlich ebenso wie für die Moleküle des System I, insbesondere unterscheiden sich die Cytochrom-Moleküle der beiden Systeme bei der Übertragung des zweiten Elektrons auf den Cytochrom-Substrat-Sauerstoff-Komplex offenbar nur geringfügig.

Wir beschreiben daher die Hellreaktion des System II, die Entleerung des Reservoirs, mit der Näherung eines Exponentialansatzes. Wir erhalten damit für das System II folgendes Reaktionsschema:



Die Indizes "red" und "ox" bezeichnen den reduzierten (Fe^{2+}) bzw. den oxidierten (Fe^{3+}) Zustand des Cytochrom P-450. Die Geschwindigkeitskonstante der Dunkelreaktion ρ_1 ist gleich der Relaxationskonstanten ρ der Funktion $B(\nu, n)$ (siehe oben); die Geschwindigkeitskonstante der Hellreaktion ρ_2 setzen wir gleich r_2 , der Geschwindigkeitskonstanten des zweiten limitierenden Schrittes im Zyklus des Cytochrom P-450.

$$\begin{aligned}
 \rho_1 &= \rho \\
 \rho_2 &= r_2
 \end{aligned}
 \tag{5.45}$$

Mit diesem Ansatz für das System II können wir die Funktion $\Delta P_{\text{II}}(\tau, \nu, n)$ explizit in allen drei Variablen angeben^{*)}

$$\begin{aligned}
 \Delta P_{\text{II}}(\tau, \nu, n) &= f' (1 - \varepsilon) \sum_{k=1}^n \{k\} \\
 \{k\} &= (\varepsilon \cdot e)^{k-1} + (1 - e) \sum_{j=0}^{k-2} (\varepsilon \cdot e)^j
 \end{aligned}
 \tag{5.46}$$

Der Faktor f' enthält die Normierung $\Delta P^{(1)}(60)$ und die Konstante B_1 , ε bezeichnet die "Entleerungsfunktion" des Reservoirs im Hellen, $(1 - e)$ die "Regenerationsfunktion" im Dunkeln

$$\begin{aligned}
 \varepsilon &= \varepsilon(\tau) = \exp(-\rho_2 \cdot \tau) \\
 e &= e(\nu) = \exp(-\rho_1 \cdot \nu)
 \end{aligned}
 \tag{5.47}$$

Für $n = 1$ reduziert sich Gl. (5.46) auf die Form

$$\Delta P_{\text{II}}(\tau) = f' \cdot [1 - \exp(-\rho_2 \tau)], \quad n = 1$$

die den Exponentialansatz für die Hellreaktion deutlich erkennen läßt.

^{*)} Zur Herleitung der Gl. (5.46) siehe Anhang C.

Anpassung und optimierte Parameter der Modellfunktion

Mit der Modellierung des System II (Gl. (5.44)) und der Angabe des daraus resultierenden Produktbeitrages (Gl. 5.46)) haben wir die Produktfunktion der Zwei-Systeme-Näherung (Gl. (5.38)) vollständig dargestellt. Wir sind damit in der Lage, die Parameter der Modellsysteme, vor allem das System I, so zu bestimmen, daß die experimentelle Produktfunktion ΔP durch die Modellfunktion $\Delta P^{(1)}$ in möglichst guter Näherung reproduziert wird. Wir führen die Bestimmung der Parameter mit Hilfe eines mehrdimensionalen "least square fit"-Verfahrens für eine allgemeine Funktion^{*)} durch, wobei als Optimierungskriterium die gerade genannte Annäherung der normierten Modellfunktion $\tilde{\Delta P}^{(1)}$ an die normierte Produktfunktion $\tilde{\Delta P}$ gilt.

Die zwei Modellsysteme werden durch insgesamt zehn Parameter beschrieben, die die Kinetik der beiden Systeme und damit auch die Modellfunktion $\Delta P^{(1)}$ festlegen.

Der Modellzyklus (System I) in der vereinfachten Darstellung (Gl. (5.13)) wird mit den sieben Parametern r_1 , r_2 , k_{CO}^- , k_{21} , k_{32} , k_{23} bzw. v und k^* vollständig beschrieben (Gl. (5.14)), das System II mit den drei Parametern ρ_1 , ρ_2 und B_1 (Gl. (5.46), (5.47)).

Wir bestimmen nicht alle Parameter durch das Anpassungsverfahren; für einige Parameter sind die Werte bereits bekannt, andere Parameter unterliegen Nebenbedingungen, die die Parameterwerte festlegen.

Die Werte für die Geschwindigkeitskonstanten der Kohlenmonoxidassoziation und -dissoziation übernehmen wir aus der Literatur (21)^{**)}

$$\begin{aligned} k_{CO}^+ &= 2.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \\ k_{CO}^- &= 0.2 \text{ s}^{-1} \end{aligned} \tag{5.48}$$

*) Siehe Anmerkung S. 39

**) Siehe nächste Seite.

woraus mit der aktuellen CO-Konzentration im enzymatischen Ansatz die pseudomonomolekulare Konstante k_{21} (Gl. (5.5)) folgt. Die Parameter ϑ_1 und ϑ_2 des System II (Gl. (5.44)) sind mit Gl. (5.45) ebenfalls festgelegt. Für die Parameter k^* und B_1 existieren Nebenbedingungen, die diese beiden Parameter zu Funktionen der übrigen Parameter machen. Die Nebenbedingungen für k^* , die Geschwindigkeitskonstante der Photodissoziation, ergibt sich aus der Lichtwirkung der Photodissoziation, die wir mit dem Lichtwert LW quantifiziert haben (Gl. (4.3)). Der Modellzyklus liefert für den Modell-Lichtwert einen Ausdruck in k^* , der die Nebenbedingung darstellt. Statt k^* direkt aus dieser Nebenbedingung zu berechnen, wurde der Lichtwert als zusätzliche Optimierungsbedingung mit in das Anpassungsverfahren aufgenommen und k^* als 'freier' Parameter behandelt^{*)}.

Für B_1 ergibt sich die Nebenbedingung aus dem Zusammenhang zwischen der Steigung des linearen Anteils der Produktfunktion und dem Wert von $B(\vartheta, n)$ (siehe Anhang C). Da die Steigung bekannt ist (durch Messung) bzw. als bekannt vorausgesetzt wird (durch Vergleich mit anderen Meßreihen), kann B_1 berechnet werden.

Die übrigen Parameter r_1 , r_2 , k_{32} ($k_{O_2}^-$) und v einschließlich k^* werden durch das Anpassungsverfahren bestimmt.

Die Modellfunktion wurde an die zwei Meßreihen der Abb. 4-4a angepaßt. Die beiden Meßreihen unterscheiden sich durch den CO-Anteil im enzymatischen Ansatz (CO : O₂ 5 : 1 und 9 : 1); sie enthalten im Bereich der Anfangskinetik (0 - 3 s) besonders viele Meßpunkte - die meisten im Abstand von 0.1 s -, womit für die Anpassung im kritischen Bereich hinreichend viele Stützpunkte vorhanden sind.

*) Hierdurch wurde eine sichere und raschere Konvergenz des Anpassungsverfahrens erreicht.

**) Der Wert für k^+ wurde durch Messungen in unserem Labor bestätigt (34)^{CO}, so daß die Übertragbarkeit der Werte (5.48) gerechtfertigt erscheint.

Die Abbildungen 5-5 und 5-6 zeigen die zwei Meßreihen $\tilde{\Delta P}$ mit der jeweils angepaßten Modellfunktion $\tilde{\Delta P}^{(1)}$ (ausgefüllte Symbole, durchgezogene Linie). Beide Abbildungen stellen auch die Meßreihe mit dem jeweils anderen CO : O₂ Verhältnis dar (offene Symbole) und den Verlauf der Modellfunktion $\tilde{\Delta P}^{(1)}$, der sich aus der angepaßten Funktion für das geänderte CO : O₂ Verhältnis ergibt (gestrichelte Linie).

Die Anpassung der Modellfunktion $\Delta P^{(1)}$ an die einzelne Meßkurve $\tilde{\Delta P}$ gelingt offensichtlich gut; die reduzierte χ^2 -Funktion, χ^2/ν , ergibt einen Wert nahe bei bzw. unterhalb von 1, so daß vom statistischen Standpunkt aus die Modellfunktion nicht mehr verbessert werden kann^{*)}.

Als Ergebnis der Anpassung erhalten wir die Werte der optimierten Modell-Parameter. Bei der Durchführung der Anpassung stellte sich heraus, daß die Modellfunktion nur sehr schwach von dem Parameter r_2 abhängt. Um die dadurch induzierte Instabilität des Anpassungsverfahrens zu umgehen, wurde der Wert des Parameters r_2 vorgegeben, und die Anpassung wurde für verschiedene Werte von r_2 wiederholt. Die Tabellen 5-1 und 5-2 zeigen die Ergebnisse für einige ausgewählte Werte von r_2 gesondert für jede Meßreihe. Wie man sieht, wird das Ergebnis der Anpassung - sowohl die Werte der optimierten Parameter als auch die Güte der Anpassung (χ^2/ν) - nur wenig durch die Wahl des Parameters r_2 beeinflusst.

Die Anpassung führt bei den zwei Meßreihen, die sich nur durch den Kohlenmonoxidanteil im enzymatischen Ansatz (CO : 50% bzw. CO : 90%) unterscheiden, auf differierende Parameterwerte, vor allem für den Parameter r_1 .

^{*)} Für die "richtige" Modellfunktion wird ein χ^2/ν -Wert von 1 erwartet. Verschiedene Modelle mit einem χ^2/ν -Wert nahe bei 1 sind statistisch gesehen gleichwertig (siehe Anmerkung S. 39).

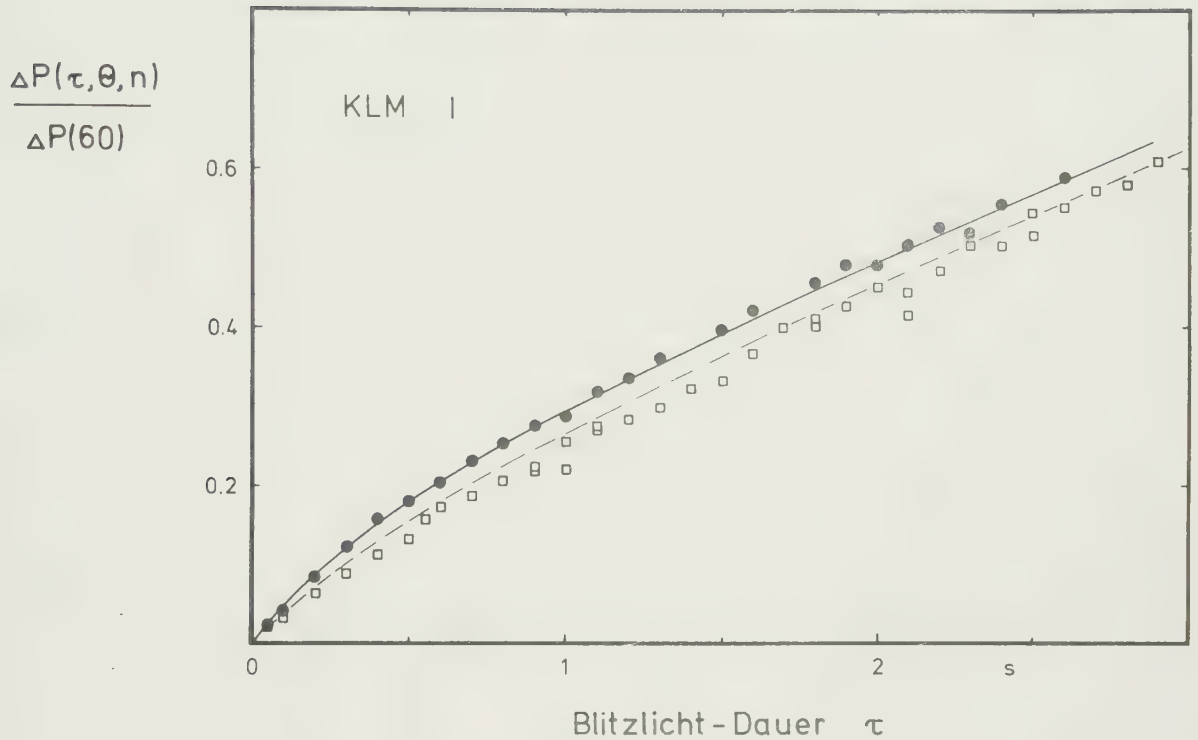


Abb. 5-5: Anpassung der Modellfunktion $\Delta P^{(1)}$ an die Meßreihe aus Abb. 4-4a, mit dem CO : O₂ Verhältnis 5 : 1.

Die durchgezogene Kurve (obere Kurve) stellt den "best fit" der Funktion $\tilde{\Delta P}^{(1)}$ an die Meßwerte der Meßreihe mit dem CO : O₂ Verhältnis 5 : 1 dar (ausgefüllte Kreise). Die gestrichelte Kurve zeigt dieselbe Funktion, jedoch mit dem CO : O₂ Verhältnis 9 : 1; im Vergleich dazu die Meßreihe mit demselben CO : O₂ Verhältnis (offene Quadrate). Die Abbildung zeigt die optimierte Funktion mit dem Parameterwert $r_2 = 0.6 \text{ s}^{-1}$; die übrigen Parameterwerte ergeben sich aus Tab. 5-1.

r_2/s^{-1}	r_1/s^{-1}	v	k_{32}/s^{-1}	k^*/s^{-1}	χ^2/v
0.2	$0.5 \pm .3$	2.9 ± 1.1	1.2 ± 0.6	6 ± 1	0.188
0.6	$0.7 \pm .2$	2.6 ± 1.5	1.7 ± 1.3	6 ± 1	0.184
1.4	$0.7 \pm .1$	3 ± 3	2 ± 4	5 ± 1	0.183
2.0	$0.7 \pm .2$	4 ± 6	1 ± 5	5 ± 1	0.186
B_0	$\simeq 65 \%$	B_1	$\simeq 35 \%$		

Tabelle 5-1: Optimierte Parameterwerte der Funktion $\Delta P^{(1)}$ aus der Anpassung an die Meßreihe mit dem CO : O₂ Verhältnis 5 : 1 (Abb. 5-5).

Bei festem Parameter r_2 ergibt die Anpassung die übrigen Parameterwerte mit der angegebenen Genauigkeit und den χ^2/v -Wert. Die relative Größe des System II (B_1 , siehe Gl. (5.43)) variiert zwischen 30% ($r_2 = 0.2 \text{ s}^{-1}$) und 40% ($r_2 = 2.0 \text{ s}^{-1}$).

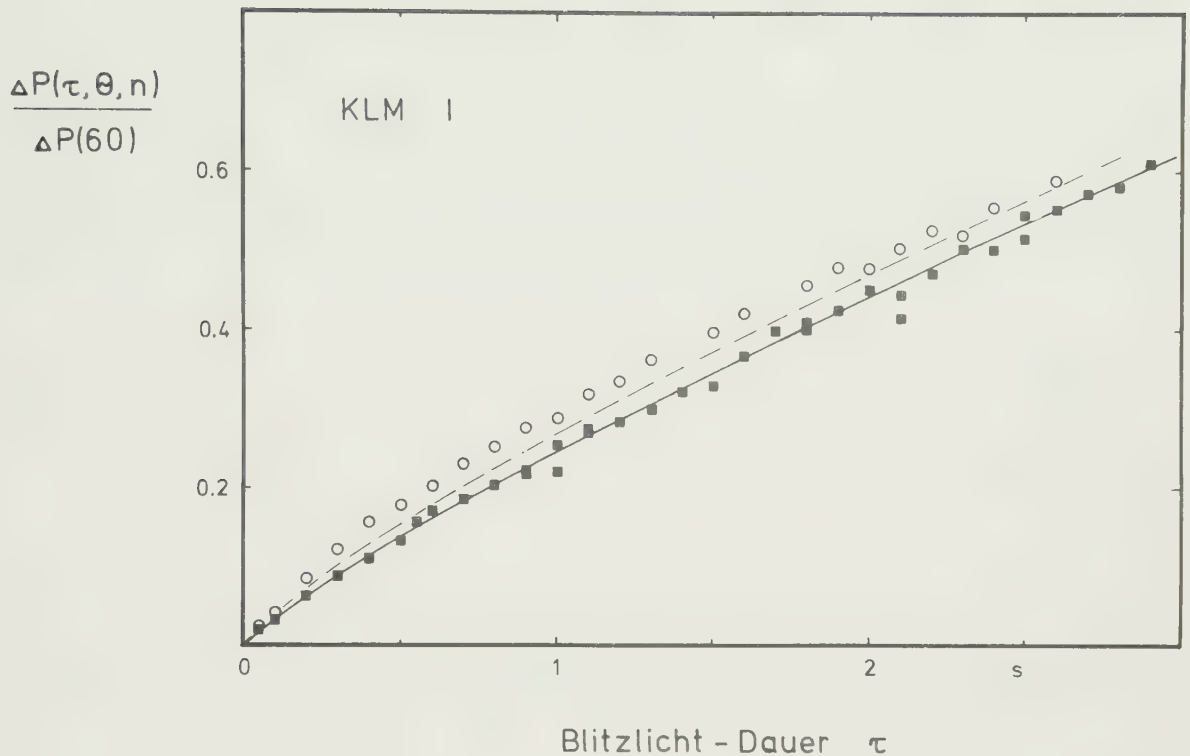


Abb. 5-6: Anpassung der Modellfunktion $\Delta P^{(1)}$ an die Meßreihe aus Abb. 4-4a mit dem $\text{CO} : \text{O}_2$ Verhältnis 9 : 1.

Diese Abbildung zeigt das Resultat, wenn die Funktion $\tilde{\Delta P}^{(1)}$ an die Meßreihe mit dem höheren CO-Anteil angepaßt wird (durchgezogene Kurve, schwarze Quadrate). Die Anpassung gelingt ebenfalls. Die gestrichelte Kurve zeigt die angepaßte Funktion für das $\text{CO} : \text{O}_2$ Verhältnis 5 : 1; im Vergleich dazu die entsprechende Meßreihe (offene Kreise). Die Parameterwerte der dargestellten optimierten Funktion ergeben sich aus Tab. 5-2 mit $r_2 = 0.6 \text{ s}^{-1}$.

$r_2/\text{ s}^{-1}$	r_1/s^{-1}	v	k_{32}/s^{-1}	k^*/s^{-1}	χ^2/ν
0.3	$0.3 \pm .1$	2 ± 2	4 ± 2	6 ± 1	1.535
0.6	$0.4 \pm .1$	2 ± 5	7 ± 16	5 ± 1	1.546
0.9	$0.4 \pm .1$	3 ± 12	6 ± 26	5 ± 1	1.546
$B_0 \simeq 60 \%$	$B_1 \simeq 40 \%$				

Tabelle 5-2: Optimierte Parameterwerte der Funktion $\Delta P^{(1)}$ aus der Anpassung an die Meßreihe mit dem CO : O₂ Verhältnis 9 : 1 (Abb. 5-6).

Die Tabelle zeigt wie Tab. 5-1 die optimierten Parameterwerte mit ihrer statistischen Sicherheit und die χ^2/ν -Werte. Größere Werte für r_2 als 1 s^{-1} erlauben keine eindeutige Anpassung mehr wegen der zunehmenden Unbestimmtheit von v und k_{32} . Die relative Größe des System II, B_1 , variiert zwischen 30% ($r_2 = 0.3 \text{ s}^{-1}$) und 40% ($r_2 = 0.6 \text{ s}^{-1}$ und $r_2 = 0.9 \text{ s}^{-1}$).

Diese Differenz zeigt sich umgekehrt darin, daß die beiden Meßreihen von der Modellfunktion mit denselben Parameterwerten und dem jeweils zugehörigen Wert für das $\text{CO} : \text{O}_2$ Verhältnis nicht zugleich optimal dargestellt werden können: siehe die gestrichelten Kurven und die entsprechenden Meßwerte (offene Symbole) in den Abb. 5-5 und 5-6.

Die Werte für v und k_{32} differieren nicht signifikant^{*)}: die Parameter v und k_{32} in Tab. 5-2 sind mit sehr großen Streubreiten (rel. Streubreite $\leq 400\%$) bestimmt, so daß im Rahmen des Modells auch andere Werte für v, k_{32} möglich sind. Die Anpassung wurde bei dieser Meßreihe ($\text{CO} : \text{O}_2$ Verhältnis 9 : 1) wiederholt, wobei für den Parameter v ein Wert angenommen wurde, der dem Verhältnis der CO-Anteile bei beiden Meßreihen entspricht (siehe Anmerkung diese Seite); die Anpassung mit den festen Werten $r_2 = 0.6 \text{ s}^{-1}$ und $v = 4.5$ ergibt im wesentlichen die gleichen Parameterwerte für beide Meßreihen - bis auf den signifikanten Unterschied für den Parameter r_1 , der bestehen bleibt (Tab. 5-3).

Für jeden optimierten Parametersatz wurde aus der Modellfunktion die relative Größe der beiden Modell-Systeme, B_0 für das System I und B_1 für das Modell II, berechnet. Die Tabellen zeigen die für beide Anpassungen einheitlichen Werte von B_0 und B_1 ; diese Werte sind vergleichbar dem Ergebnis in Abschn. 5.4 (Gl. (5.37)), wobei wir berücksichtigen müssen, daß die auf ganz unterschiedliche Weise gewonnenen Werte auf Meßreihen an zwei verschiedenen Präparationen beruhen (KLM IV in Abschn. 5.4, KLM I in diesem Abschnitt).

^{*)} Gemäß der Definition von v sollten sich die v -Werte wie die CO-Anteile verhalten, hier also wie 5 : 9 (z.B. 2.5 : 4.5).

r_2/s^{-1}	r_1/s^{-1}	v	k_{32}/s^{-1}	k^*/s^{-1}	χ^2/v
0.6	$0.4 \pm .1$	4.5	3 ± 1	5 ± 1	1.513
$B_0 \simeq 60\%$	$B_1 \simeq 40\%$				

Tabelle 5-3: Optimierte Parameterwerte der Funktion $\Delta P^{(1)}$ bei vorgegebenem Wert für v .

Mit vorgegebenem Wert für den Parameter v wird die Anpassung für k_{32} eindeutiger; k_{32} gleicht nun dem entsprechenden Wert in Tab. 5-1. Die Parameter r_1 und k^* bleiben gegenüber Tab. 5-2 unverändert. Die scheinbare Verbesserung der Anpassung (χ^2/v) rührt daher, daß hier nur drei Parameter optimiert werden (statt vier), womit sich die Zahl der Freiheitsgrade (v) um eins erhöht.

Der Wert für die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Cytochrom-Sauerstoff-Komplexes, k_{32} ($= k_{O_2}$), ist vergleichbar dem, den RÖSEN und STIER in rapid-mixing-Experimenten mit Kaliumferrocyanid finden (21). Gemäß der Definition des Parameters v (Gl. (5.15)) ergibt sich aus Tab. 5-1 das Verhältnis der Anlagerungskonstanten von Kohlenmonoxid und Sauerstoff

$$k_{CO}^+ / k_{O_2}^+ \simeq 0.6,$$

wobei wir für die Gaskonzentrationen im enzymatischen Ansatz die unterschiedliche Löslichkeit der beiden Gase berücksichtigt haben^{*)}. Vergleichen wir dieses Ergebnis ebenfalls mit denen von RÖSEN und STIER (21), so finden wir einen Unterschied von einer Größenordnung; diese Differenz schreiben wir einer unterschiedlichen Affinität des Cytochrom P-450 gegenüber dem Sauerstoff zu, da wir für die Kohlenmonoxidreaktion keine größeren Differenzen gefunden haben (siehe oben).

Die Diskrepanz der Werte für den Parameter r_1 zeigt, daß die Modellfunktion, insbesondere ΔP_I , im Bereich der Anfangskinetik empfindlich von dem Parameter r_1 abhängt: die unterschiedliche "Ausprägung" der Anfangskinetik in den beiden Meßreihen (Abb. 4-4a) - die unterschiedliche Krümmung der Kurven in der Anfangsphase - führt zu den unterschiedlichen Werten für r_1 . Gerade die Anfangsphase wird jedoch zu einem erheblichen Teil durch die Anfangskinetik des System II, die "Entleerungsfunktion" des Reservoirs, gebildet. Die Bestimmung des Parameters r_1 hängt also unmittelbar von der Beschreibung des System II ab. Wir haben für die Kinetik des System II einige sehr einfache Annahmen gemacht (Gl. (5.44) und (5.45)), die die Anfangskinetik dieses Systems sehr wahrscheinlich nicht richtig wiedergeben und somit die Ursache für die Diskrepanz in den Werten für r_1 darstellen. Die Frage

^{*)} Bei 25°C und 1 bar löst sich bei gleichem Partialdruck mehr Sauerstoff in Wasser als Kohlenmonoxid. Das Verhältnis der Löslichkeitskoeffizienten beträgt:
 $\lambda_{CO} / \lambda_{O_2} \simeq 0.8$ (35).

nach der "richtigen" Anfangskinetik führt wieder auf den Mechanismus der Reduktase-Cytochrom-Wechselwirkung: die Anfangskinetik ist entscheidend durch den Ausgangszustand geprägt, der mit dem Kohlenmonoxid-Komplex des Cytochroms nur zur Hälfte beschrieben ist - die vollständige Beschreibung muß auch den Zustand angeben, den die Reduktase angesichts der Kohlenmonoxid-Komplexe einnimmt. Ein experimenteller Hinweis liegt uns in dem Parameter y_0 vor (siehe Merkmalskatalog zu Beginn des Kapitels). Der Parameter beschreibt den sprunghaften Produktzuwachs ganz zu Beginn der Anfangskinetik, der vor allem in den Experimenten mit einmaliger Belichtung auftritt, also dort, wo der Einfluß des System II am größten ist. Dieser "Sprung" beruht möglicherweise auf einem veränderten kinetischen Verhalten der Reduktase als Folge der Kohlenmonoxid-Inhibierung.

Wechselzahl und aktive Cytochrom-Moleküle

Mit der quantitativen Bestimmung des Modellzyklus können wir auch die Wechselzahl für diesen Zyklus angeben (siehe Abschn. 5.3, Gl. (5.18)). Die Geschwindigkeitskonstanten der beiden limitierenden Schritte im Modell des Cytochrom P-450-Zyklus', r_1 und r_2 , entnehmen wir Tab. 5-1 und Tab. 5-2 bzw. Tab. 5-3. Für r_1 können wir einen Wert zwischen 0.7 s^{-1} und 0.4 s^{-1} annehmen; die Konstante r_2 ist durch die Anpassung weniger bestimmt; berücksichtigen wir auch die Werte der übrigen Parameter bei der Anpassung, so wird r_2 vermutlich im Bereich (0.2 s^{-1} , 1 s^{-1}) liegen, jedoch können wir andere Werte, z.B. $r_2 = 2 \text{ s}^{-1}$, nicht ausschließen. Wir stellen für die Wechselzahl eine Wertetafel auf, die den vermuteten Wertbereich der Konstanten r_1 und r_2 umfaßt. Wir entnehmen der Tab. 5-4 als Ergebnis für die Wechselzahl

$$10 \text{ min}^{-1} < t_n < 30 \text{ min}^{-1}$$

und setzen als wahrscheinlichen Wert für die Wechselzahl

$$t_n \simeq 20 \text{ min}^{-1}.$$

Aus der Wechselzahl und der absoluten Produktrate ergibt sich die absolute Zahl der aktiven Enzymmoleküle $(\text{Fe})_{\text{tot}}$ (siehe Gl. (5.17)). Die spezifische Aktivität der Mikrosomenpräparation KLM I ist in Tab. 4-1 mit $185 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ angegeben.

Die spezifische Aktivität bezieht sich allerdings nur auf das Produkt 7-Hydroxy-Cumarin als Indikator des Cumarinmetabolismus. Die Reaktionsprodukte des Cumarinumsatzes in Kaninchenlebermikrosomen umfassen die Monohydroxycumarine nebst drei o-Hydroxyphenylsäuren (Lactat, Acetat, Pyruvat) (41). Aus den veröffentlichten Ergebnissen (41) läßt sich - mit dem Hinweis auf die große Streubreite der quantitativen Bestimmungen - der Anteil des Umbelliferons unter den Produkten zwischen 10% und 50% vermuten. Die Produktrate aller Reaktionsprodukte des Cumarins liegt also um einen Faktor 2 bis 10 höher als die angegebenen $185 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Mit dem obigen Wert für die Wechselzahl t_n folgt

$$(\text{Fe})_{\text{tot}} \simeq 20 \dots 90 \text{ pmol mg}^{-1}.$$

Wir setzen diesen Wert in Relation zu der Anzahl der eingesetzten, spektral nachweisbaren Cytochrom P-450 Moleküle, die in Tab. 4-1 mit 1.1 nmol mg^{-1} angegeben ist. Damit können wir abschätzen, daß zwei bis acht Prozent der Cytochrom P-450 Moleküle, die wir im Spektrum des Kohlenmonoxid-Komplexes sehen, aktiv an der Hydroxylierung des Cumarins beteiligt sind.

Der geringe Prozentsatz der am Cumarinmetabolismus aktiv beteiligten Cytochrom-Moleküle läßt sich naheliegender als die Ursache für die geringe spezifische Cumarin-Hydroxylase-Aktivität der Mikrosomen deuten: Wir wissen von verschiedenen Cytochrom P-450-Spezies, die sich durch ihre unterschiedlichen Substratspezifitäten auszeichnen; das Cumarin wird möglicherweise von einer besonderen Spezies des Cytochrom P-450 umgesetzt, die nur einen kleinen Teil des

gesamten Cytochrom ausmacht und auch nicht von allen Tieren gebildet wird und dort auch nicht induziert werden kann^{*)} (41).

Die Cytochrom P-450-Substrat-Wechselwirkung ist offenbar für mehr als nur die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes verantwortlich. Die spektrale Dissoziationskonstante des Cytochrom P-450-Cumarin-Komplexes liegt über einen Faktor 100 über dem phänomenologischen K_M -Wert des Cumarin-Metabolismus ($K_S = 9 \cdot 10^{-4}$ mol/l zu $K_M = 6 \cdot 10^{-6}$ mol/l (42)). Schreibt man das "Substratbindungsspektrum" realen Cytochrom-Substrat-Komplexen zu, so wird deutlich, daß im Fall des Cumarin diese Substratkomplexe nicht mit dem Cumarinumsatz korrelieren. Anders als für Cumarin und fast alle übrigen Substrate der Cytochrom P-450-Monooxygenase wurde für das Substrat Cyclohexan eine enge Korrelation zwischen dem Substratbindungsspektrum und der spezifischen Aktivität der Cyclohexanhydroxylierung gefunden; ferner zeigte sich, daß die spektrale Dissoziationskonstante des Substratbindungsspektrums und die phänomenologische MICHAELIS-MENTEN-Konstante gleich sind. Daraus schließt ULLRICH auf eine direkte Abhängigkeit der Hydroxylaseaktivität von der Anzahl der Cytochrom-P-450-Cyclohexan-Komplexe, deren Anteil 12% des gesamten Cytochrom P-450 in unbehandelten bzw. 32% in Phenobarbital-behandelten Ratten ausmacht (43). Aus der Aktivität und dem Anteil der aktiven Enzymmoleküle läßt sich für die Cyclohexanhydroxylierung eine Wechselzahl des Enzymzyklus von 52 min^{-1} errechnen.

Vergleichen wir die Resultate für die beiden Substrate Cumarin und Cyclohexan, so sehen wir, daß die Substrate sich nicht nur in der Anzahl der aktiven Substrat-Komplexe unterscheiden,

^{*)} Untersuchungen in unserem Labor zeigten, daß die Cumarin-Hydroxylase auch in Phenobarbital-behandelten Kaninchen nicht induziert wurde (unveröffentlichte Ergebnisse).

sondern auch in der Wechselzahl, die für Cyclohexan etwa dreimal größer ist als für Cumarin^{*)}. Dieser Unterschied deutet darauf hin, daß die unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten nicht nur auf der Menge der aktiven Cytochrom-moleküle beruhen, sondern daß der Zyklus insgesamt Substrat-abhängig ist - entweder als Folge der speziellen Cytochrom-Substrat-Wechselwirkung oder als Eigenschaft der betreffenden Cytochrom-Spezies, von denen das Substrat umgesetzt wird.

^{*)} Wir müssen allerdings berücksichtigen, daß die Wechselzahl und die Anzahl der aktiven Enzyme nicht unabhängig voneinander gefunden wurden; die Ergebnisse für beide Substrate bedürfen der Absicherung dadurch, daß die Anzahl der aktiven Enzymmoleküle (für Cumarin) bzw. die Wechselzahl (für Cyclohexan) jeweils zusätzlich bestimmt wird.

r_1/s^{-1}	$r_2/s^{-1} :$	0.3	0.6	1.0	2.0
0.4		10	14	17	20
0.6		12	18	23	28
0.7		13	19	25	31

Tabelle 5-4: Wechselzahl für verschiedene Werte von r_1 und r_2 .

Die Wertetafel wurde nach Gl. (5.23) berechnet. Die Wechselzahl ist in der Einheit min^{-1} angegeben.

5.6 Literatur

- (1) V. Ullrich (1972) Angew. Chem. 84, 589
- (2) J.R. Gillette, D.C. Davis, H.A. Sasame (1972) Ann.Rev. Pharmacol. 12, 57
- (3) V. Ullrich (1977) in "Microsomes and Drug Oxidations", ed. by V. Ullrich et al., S. 192-201, Pergamon Press, Oxford
- (4) J.A. Peterson, B. Griffin (1971) Fed. Proc. 30, 1143
- (5) H. Diehl, unveröffentlichte Ergebnisse
- (6) Y. Imai, R. Sato, T. Iyanagi (1977) J. Biochem. 82, 1237
- (7) A. Matsuyama et al. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 918
- (8) Ph.L. Gigon, Th.E. Gram, J.R. Gillette (1969) Molecular Pharmacology 5, 109
- (9) H. Diehl, J. Schädelin, V. Ullrich (1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1359
- (10) T. Matsubara, J. Baron, L.L. Peterson, J.A. Peterson (1976) Arch. Biochem. Biophys. 172, 463
- (11) J.A. Peterson et al. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4010
- (12) K. Horneffer, H. Diehl (1978) Mathematik-Arbeitspapiere 17, Universität Bremen
- (13) D.S. Davis et al. (1969) zitiert nach GIGON (8)
- (14) G.T. Miwa, S.B. West, A.Y.H. Lu (1978) J. Biol. Chem. 253, 1921
- (15) H. Taniguchi et al. (1979) Biochem. Biophys. Acta 550, 341
- (16) B.S.S. Masters et al. (1965) J. Biol. Chem. 240, 4081
- (17) D.Y. Cooper et al. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4755
- (18) J.A. Peterson et al. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4431
- (19) T. Omura et al. (1965) Fed. Proc. 24, 1181
- (20) R.W. Estabrook et al. (1970) Annals N.Y. Acad. Sci. 174, 218
- (21) P. Rösen, A. Stier (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 603

- (22) O. Warburg (1948) "Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten", 2. Aufl., Verlag Dr. W. Saenger, Berlin
- (23) A.D. Rahimtula et al. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 695
- (24) F. Lichtenberger et al. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 939
- (25) R.W. Estabrook et al. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 132
- (26) F.P. Guengerich et al. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 951
- (27) Y. Ishimura, V. Ullrich, J.A. Peterson (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 140
- (28) E. Begard, P. Debey, P. Douzou (1977) FEBS Lett. 75, 52
- (29) S.G. Sligar et al. (1977) in "Microsomes and Drug Oxidations", ed. by V. Ullrich et al., S. 202-209, Pergamon Press, Oxford
- (30) F. Lichtenberger, V. Ullrich (1977) in "Microsomes and Drug Oxidations", ed. by V. Ullrich et al. S. 218-223, Pergamon Press, Oxford
- (31) I.G. Petrowski (1954) "Vorlesungen über die Theorie der gewöhnlichen Differentialgleichungen, Übersetzung a.d. Russ., 4. Aufl., Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig
- (32) H. Ihlefeld, H. Diehl (1976) FEBS Lett. 64, 111
- (33) H.S. Mason (1957) Adv. Enzymol. 19, 79
- (34) D. Schäfer (1979) Diplomarbeit, Universität Bremen
- (35) Landolt u. Börnstein (1962) "Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik und Technik", hrsg. v. H. Borchers et al., 6. Aufl., Bd. II, 2 Teil b, Berlin
- (36) R.W. Estabrook et al. (1976) in "The Structural Basis of Membrane Function", ed. by Y. Hatefi u. L. Djavadi-Ohanian, S. 429-445, Academic Press, New York
- (37) Ch.S. Young (1977) Life Sciences 21, 1047
- (38) Y. Yasukochi, J.A. Peterson, B.S.S. Masters (1979) J. Biol. Chem. 254, 7097
- (39) B.S.S. Masters et al. (1965) J. Biol. Chem. 240, 921

- (40) L.M. Siegel et al. (1971) in "Flavins and Flavoproteins",
ed. by H. Kamin, S. 523-554, University Park Press,
Baltimore (zitiert nach YASUKOCHI (38))
- (41) P.-Ch. Fink, B. v. Kerékjártó (1966) Hoppe-Seyler's
Z. Physiol. Chem. 345, 272
- (42) F. Kratz, Hj. Staudinger (1968) Hoppe-Seyler's
Z. Physiol. Chem. 349, 455
- (43) V. Ullrich (1969) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
350, 357

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Monooxygenasesystem der Leber und anderer Säugetierorgane wie Haut, Lunge, Darm setzt eine große Zahl unterschiedlicher Substrate, i.a. die "Xenobiotika", um. Das terminale Enzym des Systems, das Cytochrom P-450, tritt in verschiedenen Subspezies auf, die unterschiedliche Muster von Substratspezifitäten und unterschiedliche Induzierungs-Muster aufweisen. Die daraus folgende phänomenologische Charakterisierung der Subspezies auf der einen Seite und der Substrate andererseits erlaubt es - bis auf Ausnahmen - nicht, die jeweils für eine Substratumsetzung aktive Gruppe des Cytochrom P-450 zu identifizieren und zu quantifizieren.

Als Ansatz für die vorliegende Arbeit haben wir eine Methode entwickelt, mit der wir die Kinetik des Cytochrom P-450-Zyklus unmittelbar untersuchen können. Die experimentelle Methode benutzt die photoreversible Inhibierung der Cytochrom P-450-Aktion durch Kohlenmonoxid; die photolytische Bestrahlung der enzymatischen Ansätze löst eine Relaxationsbewegung des Enzymsystems aus, deren Kinetik durch die Produktrate einer speziellen Substratumsetzung beobachtet wird; diese Relaxationskinetik wird "Anfangskinetik" genannt. Diese Methode hat gegenüber Mischungsmethoden den Vorteil der Wiederholbarkeit des Relaxationsvorganges im selben Ansatz. Die Untersuchungen der Anfangskinetik wurden mit dem Substrat Cumarin durchgeführt, das sich durch eine hohe Spezifität auszeichnet. Das stark fluoreszierende Produkt 7-Hydroxy-Cumarin ("Umbelliferon") konnte mit Hilfe einer hochempfindlichen Fluoreszenzapparatur in kleinsten Mengen (10^{-12} mol und weniger) nachgewiesen werden.

Die Auswertung der Anfangskinetik des Enzymsystems und der "Dunkel-Relaxation" nach Abschalten der photolytischen Bestrahlung führt auf zwei "kinetische Systeme", deren eines der Aktion des terminalen Enzyms, dem Cytochrom P-450-Zyklus, zugeschrieben wird; das andere kinetische System wird mit dem Verhalten des gesamten Enzymsystems, speziell der Wechselwir-

kung von Cytochrom P-450-Reduktase und dem Cytochrom, erklärt.

Für beide Systeme stellen wir ein Modell auf. Der Modellzyklus des Cytochrom P-450 berücksichtigt die Kinetik der O_2 - bzw. CO-Anlagerung an das aktive Zentrum des Cytochroms und zwei geschwindigkeitslimitierende Schritte des Zyklus, die Übertragung des ersten Elektrons und - nicht differenziert - die Übertragung des zweiten Elektrons mit anschließender Aktivierung des Sauerstoffs. Dieses Modell kann wichtige Eigenschaften der Anfangskinetik - deren allgemeiner Verlauf und deren Abhängigkeit vom CO : O_2 Verhältnis - reproduzieren.

Die Anfangskinetik hängt weiterhin von der "Dunkel-Relaxation" des Enzymsystems ab. Wir können die Dunkelrelaxation des Enzymsystems mit der Reduktionskinetik des Cytochrom P-450 identifizieren. Das "zweite kinetische System" basiert auf dem Reduktionsverhalten eines "pools" von Cytochrommolekülen, das nur dank der Kohlenmonoxid-Inhibierung sichtbar wird. Mit jeweils einem Exponentialansatz modellieren wir die Entleerung und Regeneration dieses "pools".

Beide Modelle zusammen reproduzieren die drei wichtigsten Eigenschaften der Anfangskinetik des Enzymsystems. Wir vergleichen die modellierte mit der gemessenen Anfangskinetik und erhalten mit Hilfe eines "least square fit"-Verfahrens optimierte Werte der Modellparameter. Für die von uns untersuchte Umsetzung des Cumarins zu 7-Hydroxy-Cumarin führt die kinetische Analyse zu folgenden Resultaten:

- die Geschwindigkeitskonstanten der beiden limitierenden Schritte des Cytochrom P-450-Modellzyklus haben Werte im Bereich um 0.5 s^{-1} ,
- daraus ergibt sich für die aktiven Cytochrommoleküle eine Wechselzahl von ca. 20 min^{-1} ,

- aus Wechselzahl und absoluter Aktivität läßt sich abschätzen, daß nur 2% - 8% der spektral nachweisbaren Cytochrom P-450-Moleküle aktiv am Cumarin-Metabolismus beteiligt sind.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die spezifische Aktivität von Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasen sowohl auf der Anzahl aktiver Enzym-Substrat-Komplexe als auch auf unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften der Cytochrom P-450-Subspezies beruht.

Wir haben gezeigt, daß es möglich ist, den Reaktionszyklus mit einem auf die wesentlichen Stufen des Zyklus reduzierten Modell nachzubilden. Gleichzeitig haben wir gefunden, daß bei der Bestimmung der Anfangskinetik ein Ausgangszustand des Enzymsystems, der die Stufe des reduzierten Cytochroms einschließt, ein zweites kinetisches System induziert, dessen Anfangskinetik sich der des eigentlichen Zyklus überlagert. Dieses zweite kinetische System beruht auf der Wechselwirkung des Cytochroms mit der Cytochrom P-450-Reduktase bei angehaltenem Zyklus, so daß auch langsame Komponenten dieser Wechselwirkung zum Tragen kommen.

Diese Ergebnisse stellen den Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen der Kinetik des Monooxygenasesystems dar. Die Untersuchungen lassen sich in zweierlei Hinsicht fortführen. Einmal erscheint es wichtig, die Anfangskinetik des Cytochrom P-450-Zyklus ohne Interferenz mit anderen kinetischen Systemen zu bestimmen. Ebenso notwendig erscheint die Analyse des "zweiten kinetischen Systems", der Kinetik der Wechselwirkung von Cytochrom P-450 und Cytochrom P-450-Reduktase.

Als Untersuchungsmethode eignet sich die Bestimmung der Anfangskinetik des Enzymsystems, ausgehend von jeweils verschiedenen Anfangszuständen des Systems. Experimentell erhalten wir die Anfangskinetik verschiedener Ausgangszustände mit der "rapid mixing"-Methode:

- a) Zumischung des Elektronendonors (NADPH) zum oxidierten Ansatz: das zweite kinetische System tritt nicht auf, da sich der "pool" nicht bilden kann; ungeklärt ist der mögliche Einfluß der Reduktionskinetik der Reduktase.
- b) Zumischung von Substrat zum substratfreien Ansatz: ebenfalls Vermeidung des "pools"; ungeklärt ist die Cytochrom (Fe^{2+})-Substrat-Wechselwirkung.
- c) Zumischung von Sauerstoff zum sauerstofffreien Ansatz: der "pool" ist voll ausgebildet, Ausgangszustand sehr ähnlich dem der flash photolysis-Experimente.

Im Experiment a) und b) resultiert eine Anfangskinetik, die - im wesentlichen - allein auf der Kinetik des Cytochrom P-450-Zyklus beruht. Diese Anfangskinetik kann an Hand des hier entwickelten Modells für den Katalyse-Zyklus des Cytochrom P-450 ausgewertet werden. Die Anfangskinetik des "zweiten kinetischen Systems" ergibt sich mittelbar als Differenz der beiden Anfangskinetiken aus Experiment a) und c). Hervorzuheben ist, daß in jedem Fall - durch den Nachweis des Produkts der Substratumsetzung - die Kinetik der aktiven Cytochrommoleküle, also die Substrat- und Subspezies-spezifische Kinetik bestimmt wird.

Die Methode der Bestimmung der Anfangskinetik und der Ansatz der Differenzierung der Kinetik des Enzymsystems in zwei Teilsysteme bilden eine Basis für die gezielte Untersuchung der Cytochrom P-450-Subspezies, ihren spezifischen Substrat-Wechselwirkungen und Reaktionen im katalytischen Zyklus, die uns ein besseres Verständnis der Wirkungsmechanismen der Fremdstoff-Monooxygenasen ermöglichen.

Anhang A: Geräte

Hochintensitätsilluminationsanlage

Fa. Schoeffel Instrument GmbH, Trappenkamp
bestehend aus

- Xenonhochdrucklampe "XBO 2500 W" mit Lampengehäuse und Kondensor
- Prisma zur Vorzerlegung des weißen Lichtes
- Monochromator "GM 250", Brennweite 250 mm (2 x)
Öffnung 1 : 3,6, Dispersion 3,3 nm/mm mit
Gitter 1180 Striche/mm

Fluorimeter

"MPF-3 Fluorescence Spectrophotometer"

Fa. Bodenseewerk Perkin Elmer & Co., Überlingen

Spektralphotometer

"Aminco DW-2 UV-VIS Spektrophotometer"

Fa. American Instrument Company, USA

Digitales Multimeter

"Data Precision - 3500"

Fa. Data Precision Corp., USA über
Fa. Neumüller, München

Photoverschlüsse

"Compur-electronic-m"

Fa. Prontor-Werk Alfred Gauthier GmbH, Calmbach

Größe 1, Ø 29 mm, Öffnungszeit < 2 ms, Schließzeit < 2 ms
minimale Offenzeit 1/125 s

Größe 3, Ø 40 mm, Öffnungszeit < 3 ms, Schließzeit < 3 ms
minimale Offenzeit 1/60 s

x-t-Schreiber

"Servogor S", RE 541 Kompensationsschreiber

Fa. Metrawatt GmbH, Nürnberg

Puls-Generator

gebaut in der Elektronikwerkstatt der Universität Bremen.
Der Puls-Generator steuert mit je einem "Start"- und "Stop"-Puls die Offenzeit der Photoverschlüsse, die sich in Stufen von 1 ms variieren läßt; eine "multi-shot mode" erlaubt die n-fache ($n < 1000$) Wiederholung eines Öffnen-Schließen-Zyklus' mit einstellbarer Wartezeit zwischen den Zyklen.

Lichtleiter und Filter

Fa. Jena'er Glaswerk Schott & Gen., Mainz

- Lichtleiter Ø 10 mm, Länge 1 m, durchlässig im sichtbaren Bereich, Transmission ca. 50%
- UV Filter UG 2; $\lambda_{\max} \pm \lambda_{50\%} = 355 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$

Xenon-Hochdrucklampen

Fa. OSRAM, München

"XBO 150 W-4": Lampenkörper UV-durchlässig

"XBO 150 W-GSR": spezielle Kurzbogenlampe mit erhöhter Bogenstabilität

Rührgerät

"Sorvall Omni-Mixer"

Fa. DuPont de Nemours GmbH, Bad Nauheim

Küvetten

Fa. Hellma GmbH & Co., Müllheim

temperierbare Fluoreszenzküvetten, Standardausführung QS

Anhang B: Näherungsweise Lösung für x_2

Das Differentialgleichungssystem (5.11) ergibt für x_2 eine Differentialgleichung folgender Form an:

$$\dot{x}_2 = -ax_2 + b(t) \quad (\text{B.1})$$

mit dem konstanten Koeffizienten a und der zeitabhängigen Funktion b

$$a = k_{21} + k_{12} + k_{23} \quad (\text{B.2})$$

$$b(t) = (k_{32} - k_{12})x_3 + (r_1 - k_{12})x_4 + k_{12}$$

Die allgemeine Lösung der Differentialgleichung (B.1) lautet

$$x_2 = x_{20} e^{-at} + \int_0^t b(s) e^{-a(t-s)} ds \quad (\text{B.3})$$

Das Integral in Gl. (B.3) läßt sich näherungsweise lösen. Für die Funktion b gilt, daß sie absolut beschränkt ist wegen Gl. (5.6b)

$$0 < b(t) < \beta \text{ für alle } t$$

wobei β die Größenordnung von 1 hat. Betrachten wir Zeiten, die groß gegen die reziproke Zeitkonstante a^{-1} sind

$$t \gg a^{-1},$$

so können wir in guter Näherung die Integration in Gl. (B.3) auf einen Bereich in der "Nähe" der oberen Grenze des Integrals beschränken

$$\int_0^t b(s) e^{-a(t-s)} ds \simeq \int_{t-\varepsilon}^t b(s) e^{-a(t-s)} ds ; \quad (\text{B.4})$$

$t \gg a^{-1}$

wobei $\mathcal{E} = r \cdot a^{-1} \ll t$ ($r = 3, \dots, 10$). Weiterhin können wir annehmen, daß für den betrachteten Zeitraum ($t \gg a^{-1}$) schnelle Änderungen der Funktion $b(t)$ abgeklungen sind, so daß wir $b(t)$ innerhalb der Zeitspanne $\mathcal{E}$ als konstant ansetzen können

$$b(s) \approx \text{const} = b(t) \quad (t - \mathcal{E} \leq s \leq t) \quad (\text{B.5})$$

Mit den Näherungen (B.4) und (B.5) erhalten wir aus Gl. (B.3) für x_2

$$x_2 \approx \frac{1}{a} b(t), \quad t \gg a^{-1} \quad (\text{B.6})$$

Diese Lösung (Gl. (B.6)) ergibt sich formal aus Gl. (B.1), wenn man dort $\dot{x}_2 = 0$ setzt (siehe Gl. (5.12)). Der Zusammenhang zu der obigen Ableitung besteht darin, daß wir in Gl. (B.5) die Funktion b als konstant betrachtet haben innerhalb eines Intervalls $\mathcal{E}$. Der Ansatz $\dot{x}_2 = 0$ beschreibt also den quasi-konstanten Zustand des Systems; bezogen auf größere Zeiträume ($\Delta t \gg \mathcal{E}$) bleibt die zeitliche Änderung des Systems (eingeschlossen x_2) bestehen.

Anhang C: Die Funktion ΔP_{II}

Der Produktzuwachs des System II, ΔP_{II} , wird mit der "Entleerung" eines Reservoirs beschrieben. Bei Mehrfachbestrahlungen der Probe ist der Zustand des Reservoirs eine Funktion der vorangegangenen Belichtungen und der Dunkelzeiten zwischen ihnen.

Bezeichnen wir mit R_k den Zustand des Reservoirs zu Beginn der k-ten Belichtung, so ist der Produktbeitrag des System II bei der k-ten Belichtung

$$(\Delta P_{II})_k = R_k \cdot (1 - \mathcal{E}(\tau)) \quad (C.1)$$

wobei $\mathcal{E}(\tau)$ die "Entleerungsfunktion" des Reservoirs darstellt (siehe Gl. (5.47)). Nach der Belichtung befindet sich das Reservoir im Zustand R'_k

$$R'_k = R_k \cdot \mathcal{E}(\tau) \quad (C.2)$$

von dem es entsprechend der "Regenerationsfunktion" des Reservoirs $e(\nu)$ (siehe Gl. (5.47)) in den Zustand R_{k+1} übergeht

$$\begin{aligned} R_{k+1} &= R'_k + (R_1 - R'_k) (1 - e(\nu)); \\ &= R'_k e(\nu) + R_1 (1 - e(\nu)); \end{aligned} \quad (C.3)$$

hier bezeichnet R_1 den Ausgangszustand des Reservoirs vor der ersten Belichtung (stationärer Dunkelzustand des Reservoirs).

Aus Gl. (C.2) und Gl. (C.3) erhalten wir eine Rekursionsformel für R_k

$$R_{k+1} = R_k \mathcal{E}(\tau) e(\nu) + R_1 (1 - e(\nu)) \quad (C.4)$$

womit wir einen allgemeinen Ausdruck für R_k finden

$$R_k = R_1 (\varepsilon \cdot e)^{k-1} + R_1 (1-e) \sum_{j=0}^{k-2} (\varepsilon \cdot e)^j \quad (C.5)$$

Für n Belichtungen setzt sich ΔP_{II} aus der Summe der n einzelnen Beiträge $(\Delta P_{II})_k$, $k = 1, \dots, n$, zusammen

$$\begin{aligned} \Delta P_{II} &= \sum_{k=1}^n (\Delta P_{II})_k \\ &= \sum_{k=1}^n R_k (1 - \varepsilon(\tau)) \end{aligned} \quad (C.6)$$

Ersetzen wir in Gl. (C.6) R_k durch den Ausdruck (C.5), ergibt sich

$$\Delta P_{II} = R_1 (1-\varepsilon) \sum_{k=1}^n \left[(\varepsilon \cdot e)^{k-1} + (1-e) \sum_{j=0}^{k-2} (\varepsilon \cdot e)^j \right] \quad (C.7)$$

R_1 ist bis auf den Normierungsfaktor identisch mit B_1 , der relativen Größe des System II.

Berechnung von B_1

Der Produktzuwachs im stationären Hellbereich wird in der normierten Darstellung durch folgenden Ansatz beschrieben:

$$\tilde{\Delta P}(\tau) = A \tau + B_0 + B_1 ; \tau \text{ "groß"} \quad (C.8)$$

wobei B_1 den relativen Produktbeitrag des System II kennzeichnet. Den Produktbeitrag des System II erhalten wir aus der Differenz der gemessenen Steigung A zu der Steigung $A^{(0)}$, die sich aus dem System I ohne Berücksichtigung des System II ergibt:

$$\left. \begin{array}{l} \text{gemessene} \\ \text{Steigung} \end{array} \right\} A = \frac{a}{\Delta P(60)} = \frac{a}{\Delta P_I(60) + \Delta P_{II}(60)}$$

$$\left. \begin{array}{l} \text{gerechnete} \\ \text{Steigung} \\ \text{System I} \end{array} \right\} A^{(0)} = \frac{a}{\Delta P_I(60)}$$

$$A^{(0)}/A = \frac{\Delta P_I(60) + \Delta P_{II}(60)}{\Delta P_I(60)}$$

woraus sich $\Delta P_{II}(60) \equiv R_1$ ergibt:

$$R_1 \equiv \Delta P_{II}(60) = (A^{(0)}/A - 1) \Delta P_I(60) \quad (C.9)$$

Durch Normierung von R_1 erhalten wir B_1 :

$$B_1 = \frac{R_1}{\Delta P(60)} = \frac{R_1}{\Delta P_I(60) + \Delta P_{II}(60)} \quad (C.10)$$

bzw. wenn wir $R_1 \equiv P_{II}(60)$ berücksichtigen

$$B_1 = \frac{R_1}{\Delta P_I(60) + R_1} \quad (C.11)$$

Wir ersetzen in Gl. (C.11) R_1 durch den Ausdruck (C.9) und erhalten

$$B_1 = 1 - A/A^{(0)} \quad (C.12)$$

$A^{(0)}$ ergibt sich aus dem Modellansatz für ΔP_I , der Produktfunktion $\Delta P^{(0)}$ (siehe Gl. (5.40)), A ist experimentell bestimmbar.

Mit der vorliegenden Arbeit habe ich zugleich ein für mich neues Arbeitsgebiet, das der Biophysik/Biochemie, begonnen. So sehr mich dieses neue Gebiet reizte, so war es doch nicht immer einfach, mich in die biochemischen Methoden und Handhabungen hineinzufinden. Ich danke allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des naturwissenschaftlichen Bereichs der Universität, die mich hierin unterstützt haben; durch deren zahlreiche Hinweise und Hilfen konnte ich viel lernen. Im einzelnen danke ich Herrn Prof. Dr. H. Diehl für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine Unterstützung und für sein fortwährendes Interesse im Laufe der Arbeit. Herrn Prof. Dr. H. Schwegler danke ich für die Diskussionen und Anregungen zum analytischen Teil der Arbeit, Herrn Prof. Dr. D. Beyersmann für seine Beteiligung an den präparativen Untersuchungen. Zu Dank verpflichtet bin ich Frau E. Pommerenke und Frau R. Matzullok, die mich bei der Herstellung der biologischen Präparationen und bei der Durchführung der Messungen erheblich unterstützt haben. Ihren Anteil an dem apparativen Aufbau haben auch die Werkstätten der Universität - hier danke ich vor allem Herrn O. Siggelkow aus der Mechanik - und Herrn E. Sydow aus der Elektronik-Werkstatt. Die Dissertation muß natürlich in die Maschine geschrieben werden. So danke ich last but not least Frau B. Willenberg für ihre Mühe beim Schreiben und Korrigieren dieser Arbeit.

Veröffentlichungen im Rahmen der Dissertation

"Investigations on the single step of the turnover of cytochrome P-450",

H. Ihlefeld, H. Diehl, Vth International Biophysics Congress, Copenhagen 1975

"Elementary Turnover Measurements on the Mono-oxygenase System from Liver Microsomes: Measurement of Initial Kinetics",

H. Ihlefeld, H. Diehl (1976) FEBS Lett. 64, 111

"Untersuchungen zur Kinetik der Sauerstoffanlagerung an das Hämprotein P-450",

H. Ihlefeld, H. Diehl (1976) Jahrestagung der Dt. Ges. f. Biophysik, Regensburg

"Initial Kinetics of the Liver Microsome Mono-oxygenase System: Measurements and Calculations",

H. Ihlefeld (1978) Sixth European Workshop on Drug Metabolism, Leiden

